

Protinádorová léčiva III – „cílená“ terapie

Cílená protinádorová terapie

V druhé polovině minulého století se chemoterapie přiřadila k chirurgickým zásahům a radioterapii jako jeden ze základních způsobů léčby rakoviny. Byly objeveny nové účinné protinádorové léky a nalezeny způsoby, jak tyto léky aplikovat, aby byla potlačena jejich nežádoucí toxicita. Přes nesporné úspěchy klasické chemoterapie se však od 90. let minulého století dostávalo stále více do popředí její omezení. Hlavním cílem výzkumu a vývoje protinádorových léčiv se stalo zvýšení selektivity a účinnosti nových přípravků.

Základní charakteristikou nádorových buněk je rychlý růst a nekontrolované množení. Protinádorové léky byly nazvány cytostatika, protože růst a množení buněk potlačují. Působí především na rychle rostoucí nádorové buňky, ale brzdí do jisté míry i růst a množení i některých tkáňových buněk. Z toho vyplývají některé nežádoucí vedlejší účinky dosavadních cytostatik, z nichž je závažné zejména narušení krvetvorby. Začaly proto být hledány další rozdíly mezi nádorovými a normálními buňkami organismu

Zvyšovat selektivitu protinádorové léčby umožnil zejména prudký rozvoj poznání příčin vzniku nádorů založený na poznáních molekulární biologie a genetiky. Ukázalo se, že některé mutace DNA způsobují rozdíly ve funkci řady enzymů a dalších bílkovin mezi nádorovými a normálními buňkami. Zrodil se pojem **cílené terapie** (targeted therapy), orientovaný na vývoj léčiv a léčebných postupů, které mohou do značné míry normalizovat průběh abnormálních buněčných procesů v nádorových buňkách, aniž by výrazně negativně ovlivnily podobné procesy v normálních buňkách.

Cílená terapie se zaměřuje především na blokování přísunu živin nově se tvořícími cévami v nádoru, inhibici metabolických procesů odlišných od normálních buněk, potlačení růstu buněk nezávislého na vnějších signálech, brzdění specifického průběhu buněčného dělení v nádorových buňkách, potlačování „nesmrtelnosti“ a vyhýbání se buněčné smrti nádorovými buňkami, potlačení invazivnosti nádorových buněk a metastázování, obnovení přepisu genů kódujících protinádorově účinné biomolekuly a aktivaci mechanismů imunitního systému k zásahu proti nádorovým buňkám. Pro cílenou terapii byla nejprve použita nízkomolekulární léčiva, nyní se při ní uplatňují různé biopolymery, především monoklonální protilátky. Použití těchto látek jako léčiv je někdy označováno jako biologická terapie (viz Farm10), což však není zcela přesné.

Cílená terapie je někdy – hlavně v médiích – považována za bezpečný protiklad chemoterapie. Přínosy cílené nebo „biologické“ terapie pro bezpečnost protinádorové léčby jsou nesporné, ale ani na tato léčiva nelze nahlížet zcela nekriticky. Nová „cílená“ nebo „biologická“ léčiva („biofarmaka“) působí sice selektivněji než klasická cytostatika, **zcela selektivní však nejsou a stále mají různé nežádoucí vedlejší účinky.**

Problémem je např. možnost poškození funkce srdce a cévního systému inhibitory angiogeneze. Jiná cílená léčiva mohou narušit svými vedlejšími účinky činnost jater, vyvolávat poruchy v zažívacím traktu nebo svědění a další nežádoucí kožní projevy. Jiným problémem je, že mnohá cílená léčiva ztrácejí účinnost tím, že se dalšími mutacemi genů v nádorových buňkách vyvine na ně rezistence.

Z různých cílených nízkomolekulárních léčiv se budeme nejprve zabývat látkami využívanými při terapeutických postupech kombinujících působení různých chemických látek a záření. Následovat bude přehled dalších nízkomolekulárních látek, které více či méně selektivně brzdí růst nádorových buněk v důsledku blokování procesů, které jsou důležité pro růst a množení buněk a které v nádorových tkáních probíhají nekontrolovaně.

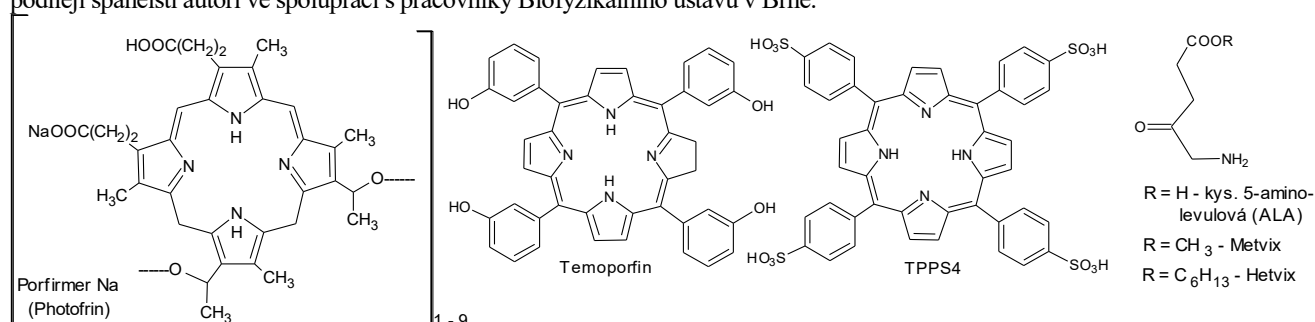
Fotodynamická terapie

Před zhruba 30 lety se jako nový způsob léčby nádorů objevila tzv. fotodynamická terapie (FDT). Ukázalo se, že některé fotosenzibilizující látky jsou zvýšenou měrou absorbovány nádorovými buňkami. Po ozáření světlem o vhodné vlnové délce fotosenzibilizátor vyvolá v buňce vznik singletového kyslíku a volných radikálů. Ty ozářené buňky ničí. Neozářené buňky a buňky neobsahující fotosenzibilizátor nepronikl, poškozovány nejsou. Zásah je proto vysoce selektivní.

Možnosti fotodynamické terapie jsou však omezeny na nádory na povrchu těla nebo tělních dutin, které lze ozářit. Zdrojem světla jsou speciální lasery, jimiž lze nádorovou tkáň ozařovat přímo nebo pomocí světlovodů zavedených do tělní dutiny. Světlo ale proniká jen do malé hloubky nádorové tkáně, zejména v případě zbarvených melanomů. Nevýhodou FDT je i poměrně dlouho přetrvávající fotosenzitizace způsobená určitou, i když menší absorpcí fotosenzibilizátoru v buňkách zdravé pokožky. Fotosenzitizace omezuje frekvenci terapeutických zásahů a nedovoluje ošetřenému pacientovi, aby se po určité době vystavoval slunečnímu záření. Fotosenzibilizátor se aplikuje 48-96 hodin před ozáření, poškozená tkáň se zahojí do 8 týdnů po ozáření. Povrchové nádory, na něž lze aplikovat FDT, jsou však většinou snadno přístupné i pro chirurgický zásah, kterému dávají onkologové přednost. FDT se zatím významněji neuplatnila, přestože u kožních nádorů může mít lepší kosmetický efekt. Předchozí ani následná chemoterapie nebo radioterapie použití FDT nevylučuje.

Prvním povoleným fotosenzibilizátorem byl derivát hematoporphyrinu, **porfirmer**, (Photofrin, Photobarr). Následovala **kyselina 5-aminolevulová** (ALA), prekurzor porfyrinů, a také její estery (methylester – Metvix, n-hexylester – Hetvix). ALA a její estery se používají v dermatologii k léčbě prekanceróz, hlavně se však uplatnily v diagnostice. Po podání ALA se v nádorové tkáni zvýší obsah porfyrinů, které při ozáření fluoreskují a tím nádor prozradí. Tím může být zvýšena přesnost chirurgického odstraňování nádorové tkáně z různých orgánů.

Fotosenzibilizátory 2. generace aktivuje světlo delších vlnových délek, které do nádoru proniká hlouběji. Jsou to jednak další deriváty porfyrinů, např. meso-tetra(4-sulfofenyl)porfyrin, **TPPS4** nebo i jiné planární kovové komplexy (chloriny s porfyrinovým skeletem odvozeným od chlorofylu nebo bakteriochlorofylu, deriváty ftalocyaninu nebo naftalocyaninu). Použití TPPS4 nebylo povoleno pro údajnou neurotoxicitu, lékaři z Karlovy university ale ukázali, že chromatograficky vyčištěný produkt neurotoxicitkou není. Aplikace tohoto senzibilizátoru byly v ČR poměrně intenzivně studovány, přípravek však byl nakonec povolen pouze pro použití ve veterinárním lékařství. Z dalších fotosenzibilizátorů byl klinicky odzkoušen a v EU povolen ještě m-tetrahydroxyfenylchlorin, **temoporfin** (Foscan) pro léčbu nádorů hlavy a krku, v Rusku byl povolen hydroxyhlinitý komplex sulfonovaného ftalocyaninu. Ani tyto senzibilizátory 2. generace se však v protinádorové léčbě výrazněji neuplatnily. Úspěšnější byl pouze derivát benzoporphyrinu, **verteporfin** (Visudyne), který však není určen pro protinádorovou léčbu, ale pro oční lékařství – fotodynamickou léčbu tzv. „vlhké“ formy věkem podmíněné makulární degenerace, vyvolané nadměrnou tvorbou nových cévek v sítnici, krvácením a zjizvením sítnice, které vede k oslepnutí. Mezi nově studovanými fotosenzibilizátory se objevily některé komplexy iridia. Na studiu komplexů Ir^{III} s navázanými deriváty kumarinu se podílejí španělská autoři ve spolupráci s pracovníky Biofyzikálního ústavu v Brně.



V poslední době začalo být studováno několik zajímavých variant fotodynamické terapie. Jednou je VTP (Vascular-Targeted Photodynamic Therapy), „na cévy zacílená“ FDT, která je zkoušena při léčbě raných stadií nádorů prostaty. Je založena na podání fotosenzibilizátoru do krevního oběhu a následné likvidaci nádorových buněk v prostatě po ozáření laserem. VTP přitom úspěšně nahrazuje radikální chirurgický zákrok spojený s následnými komplikacemi. Kombinace FDT s hypertermií spočívá v použití liposomů obsahujících fotosenzibilizátor ničící nádor po osvětlení a nanočástice železa nebo zlata teplem, které nanočástice produkují po aplikaci vysokofrekvenčního pole. Jinou variantou je MDT, „mikrodynamická terapie“, s nanočásticemi oxidu titaničitého, které po aktivaci mikrovlnami nebo ultrazvukem likvidují nádorové buňky reaktivními kyslíkatými radikály. V Číně jsou jako fotosenzibilizátory studovány dipirydylové komplexy iridia nebo ruthenia, které mohou být aktivované dlouhovlnným světelným zářením pronikajícím hlouběji do tkáně nebo v kombinaci s metalorganickými vrstvičkami obsahujícími hafnium i rentgenovým zářením. Další varianta má překonat problém FDT spočívající v tom, že nádorové buňky jsou hypoxické, chudé na kyslík, což komplikuje jejich likvidaci za účasti kyslíkatých radikálů. Přitom se využívá navázání cytotoxické látky (ve zkoušeném přípravku GS-DProSw jde o antibiotikum gramicidin S) na zářením přepínatelnou molekulu obsahující diarylethenový segment. Působením UV záření je produkt inaktivován, po ozáření viditelným světlem se obnoví původní účinný isomer produktu, který pak likviduje jen osvětlené buňky nádoru a ne okolní zdravé buňky.

Borová neutronová záchytová terapie

Jedním ze způsobů selektivní terapie nádorových onemocnění je vedle již zmíněné fotodynamické terapie tzv. **borová neutronová záchytová terapie** (boron neutron capture therapy, BNCT).

BNCT se využívá při léčbě glioblastomu multiforme, agresivního nádoru mozku se špatnou prognózou, zkouší se v terapii zhoubného melanomu a nádorů jater. K léčbě glioblastomu byl k dispozici jen chirurgický zákrok nebo radioterapie. Tyto zásahy byly však rizikové a šance na vyléčení malá. Buňky glioblastomu mohou kumulovat sloučeniny boru. Po aplikaci sloučeniny obsahující izotop ¹⁰B, jako je **4-boronofenylalanin** nebo **sodná sůl merkaptododekaborátu** (zkoušeny jsou i konjugáty karboranů s inhibitory tyrosinkinasy) a následném ozáření nádoru filtrovaným svazkem neutronů, jsou neutrony zachyceny atomy boru. Přitom vznikne excitovaná forma izotopu ¹¹B, která se rozpadá na lithium a částici α. Ta má vysokou energii, ale jen velmi malý dolet (5-9 μm). Ničí proto jen buňky obsahující sloučeninu boru. Zásah je tak vysoce selektivní. Díky tradici výzkumu a výroby sloučenin boru v Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži patří ČR mezi několik málo zemí na světě, kde tato metoda může být aplikována. Komericializací výsledků ÚACh AV ČR se zabývá česká firma Katchem, která se stala předním světovým dodavatelem sloučenin boru pro BNCT. Předností borové neutronové záchytové terapie je poměrně krátká doba léčení – celá terapie vyžaduje jen 3 dny hospitalizace a jedno 30minutové ozáření, zatímco konvenční radioterapie až 30 ozáření a pobyt v nemocnici trvající asi 5 týdnů. Po léčbě přežívá po 5 letech od léčby 58% pacientů, zatímco u pacientů léčených jiným způsobem to bylo pouze 1%. Nevýhodou však je omezená dostupnost zdroje neutronů – reaktoru nebo lineárního urychlovače, v němž neutrony vznikají ostřelováním atomů lithia nebo beryllia protony.

Antiangiogenní terapie

Významnou skupinu cílených léčiv představují **antiangiogenní látky**, které blokují vznik nových cév zásobujících nádory krví. Inhibitory angiogeneze nádor neeliminují, ale zamezí, aby byl vyživován.

Rostoucí nádorové buňky potřebují dostatek kyslíku a živin. Jakmile nádor naroste, přestává být zásobování nádorových buněk dostačující. Krví nevyživovaný nádor se zmenšuje a může být snáze likvidován imunitním systémem organismu, popř. radioterapií nebo chemoterapií. Antiangiogenní léčiva se proto často používají v kombinaci s cytostatiky.

Na nedostatek kyslíku reaguje buňka tvorbou hypoxií indukovaných faktorů, zejména HIF-1. HIF stimuluje expresi některých genů, což zajišťuje adaptaci buněk na dané podmínky. Výsledkem je mimo jiné zvýšená tvorba vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a některých dalších růstových faktorů s podobným účinkem. VEGF sekretovaný hypoxickými buňkami spouští angiogenezi, tj. předává signál buňkám cévní výstelky k tomu, aby z nich vyrostly nové krevní kapiláry, které pak zajišťují zásobování nádoru živinami i kyslíkem.



Antiangiogenní léčiva mohou účinek HIF-1, VEGF a podobných růstových faktorů podporujících angiogenezi různým způsobem blokovat. Patří mezi ně řada bílkoviny, peptidy i nízkomolekulární látky.

Jejich výhodou je, že efektivní terapie zacílená na cévy v nádoru může být jednotná u různých druhů rakoviny, protože všechny cévy vyživující nádory jsou u všech typů pevných nádorů v podstatě stejné. Další výhodou je, že podat léčivo do cév je podstatně snazší, než zajistit, aby z cév proniklo do nádorových buněk. Antiangiogenní léčiva by také neměla být příčinou vzniku rezistence nádorových buněk, která často vede k neúspěchu léčby konvenčními cytostatiky.

Na druhé straně mohou ale antiangiogenní látky blokovat vznik nových cév i tam, kde je jejich vznik žádoucí. Jejich podání je proto vyloučeno v těhotenství, kdy se tvoří nové cévy rostoucího embrya. Mohou však negativně působit i na dospělý organismus, např. zvyšovat riziko embolie tvorbou krevních sraženin nebo mohou brzdit hojení ran. Pro regenerativní léčbu jsou dokonce vyvíjeny některé angiogenní látky, které naopak vznik nových cév podporují. Z nich byl např. schválen gel pro léčbu vředů na nohách diabetiků, zkouší se léky, které by byly přínosem pro léčbu ischemické choroby srdce.

Přirozené inhibitory angiogeneze byly izolovány z krevních destiček nebo z chrupavek. Největší pozornost vzbudily proteiny **angio-*statin*** a **endostatin**, po jejichž kombinovaném podání došlo u myši k vymizení i poměrně velkých nádorů. Klinické zkoušky u lidí ale tyto výsledky nepotvrdily. V Číně byl před časem do protinádorové terapie nemalobuněčných nádorů plic zaveden **endostar**, rekombinantní lidský endostatin doplněný o sekvenci 9 aminokyselin, který je produkován bakteriemi *Eschecheria coli* s pozměněným genomem. Endostar je podáván v kombinaci s jinými protinádorovými léky. Přirozené antiangiogenní látky měly údajně být obsaženy ve žraločích chrupavkách, v nichž se nevyskytují žádné cévy, klinické zkoušky extraktů žraločích chrupavek u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním plic, prostaty a prsu však jejich protinádorovou účinnost nepotvrdily.

Z praktického hlediska bylo významné zjištění, že antiangiogenní účinky má celá řada přirozených i syntetických nízkomolekulárních látek. Z přirozených látek to je plísňový metabolit **fumagilin** a jeho polosyntetický derivát **TNP-470** (dříve AGM-1470), zatím neúčinnější nízkomolekulární inhibitor angiogeneze, který však je v potřebné dávce neurotoxický, další plísňový metabolit **eponeymycin**, antibiotika **minocyklin** a **neomycin**, **kombretastatiny A-1** a **A-4** izolované z kůry africké keřovité vrby *Combretum caffrum* (Zuluové používali extrakt kůry jako šípový jed), **skvalamin**, metabolit estradiolu **2-methoxyestradiol**, jed hada ploskolebce amerického (*Agkistrodon contortrix*) **kontortrostatin** a řada dalších.

Antiangiogenní a současně antimetastatickou účinnost mají inhibitory matricových metaloproteinás.

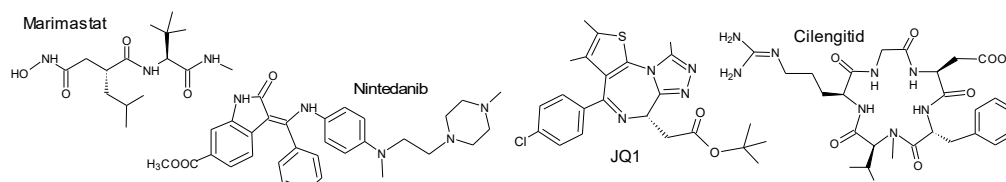
Matricové metaloproteinasy, MMP, jsou zinek obsahující enzymy, které degradují bílkoviny extracelulární matrice tvořící „kostru“ tkání. Tím umožňují jak vznik nových cév, tak i únik nádorových buněk z primárního nádoru, jejich šíření krevním oběhem a vznik metastáz. Inhibitory MMP by proto mohly brzdit zásobování primárního nádoru krví i vznik sekundárních nádorů v jiných tkáních. Inhibiční aktivitu mají látky, které mohou vázat zinek za vzniku chelátů. Enzym zbavený zinku je pak nefunkční. Nejčastěji jde o hydroxamáty, zkoušeny však byly i jiné látky. Výzkum inhibitorů MMP, nejčastěji hydroxamátů, byl považován za perspektivní. Klinicky byl v kombinaci s některými cytostatiky zkoušen především **marimastat**. Výsledky však byly zklamáním, příčinou byly nepříznivé vedlejší účinky na svalstvo a kosti, které se předtím u pokusných zvířat neprojevovaly a které si vynutily snížení dávky inhibitoru pod terapeuticky účinnou úroveň. Neosvědčily se ani další inhibitory MMP (prinomastat, batimastat). Nyní se jako možné vysvětlení ukazuje, že nádorové buňky, kterým se nedaří narušit extracelulární maticí pomocí MMP, mohou vytvářet výrůstky plné aktinových vláken sloužící jako „beranidlo“, které snad mohou maticí prorazit mechanicky (po dodání energie z mitochondrií) a tím umožnit průnik nádorových buněk do dalších orgánů jako předpoklad metastázování.

Z nízkomolekulárních inhibitorů angiogeneze je třeba zmínit **thalidomid** a další „**imunomodulační léky**“ (viz Farm8). Další skupinu inhibitorů tvoří látky, které blokují receptory pro růstové faktory.

Patří mezi ně především **nintedanib** (Ofev nebo Vargatef, Boehringer- Ingelheim). Blokáda receptorů pro růstové faktory v buňkách vytvářející cévy v nádorech vede k jejich apoptóze a destrukci cév v nádorech. Nintedanib byl povolen v r 2014 v kombinaci s docetaxelem jako terapie druhé volby u metastázujících nemalobuněčných nádorů plic, zkoušen je při léčbě nádorů střev. Má jen malou biologickou dostupnost a je kritizován za vysokou cenu, která není úměrná jeho léčebnému přínosu. Klinicky zkoušen je derivát thienotriazolodiazepinu **JQ1**, který by mohl významně přispět k léčbě „trojnásobně negativních“ (negativně testované na přítomnost estrogenních, progesteronových a HER2 receptorů) nádorů prsu, které nereagují na hormonální léčbu ani na léčbu protilátkami proti receptoru HER2 (= Human Epidermal growth factor Receptor 2). Problémem řady inhibitorů angiogeneze je jejich špatná distribuce do nádorové tkáně, kde pak inhibitory nemají koncentraci postačující k požadovanému účinku. Antiangiogenní účinek má i řada inhibitorů proteinkinas receptorů pro VEGFR, které budou zmíněny později.

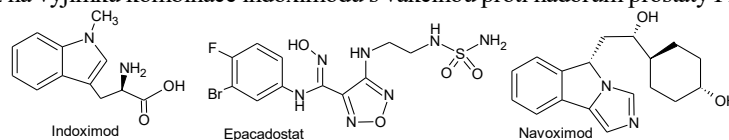
Jiným typem léčiv blokujících angiogenezi a metastázování jsou **inhibitory integrinů**, které snad mají lepší perspektivu uplatnění v onkologické terapii než inhibitory MMP.

Integriny jsou receptory na povrchu buněk, které se podílejí na adhezi buněk k extracelulární matici tkání a zprostředkovávají signály buňkám, aby rostly a dělily se nebo naopak růst zastavily, pokud by překročily prostor tkáně („kontaktní inhibice“). V nádorových buňkách jsou funkce integrinů narušené. To umožňuje prorůstání a metastázování nádoru. Z nových inhibitorů dospěl do fáze III klinických zkoušek cyklický pentapeptid **cilengitid**, cyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-methylVal), přitom ale nebyl zcela úspěšný – neprodlužoval pacientům život. V poslední době se ale ukázalo, že může být účinný při léčbě glioblastomu, jednoho typu nádorů mozku.



Angiogenezi a metastázování blokuje i nová skupina protinádorově účinných **inhibitorů indolamin-2,3-dioxygenasy-1 (IDO1)**, které vzbudily zájem pro schopnost potlačovat imunosupresi nádorových buněk a zlepšovat účinnost chemoterapie, radioterapie i imunoterapie, aniž by zvyšovaly jejich vedlejší účinky.

IDO1 patří spolu s dalšími enzymy katabolismu tryptofanu IDO2 a TDO mezi enzymy, jejichž aktivita ovlivňuje řadu důležitých buněčných procesů. IDO1 odbourává tryptofan na kynurenin. Je aktivován v nádorových buňkách a jeho zvýšená aktivita je spojována se selháváním různých způsobů protinádorové terapie, klasické i moderní cílené. Zájem o inhibitory IDO1 proto rostl. V průběhu posledních 10 let byly zahájeny klinické zkoušky prvních protinádorových léčiv z této skupiny **indoximodu**, **epakadostatu** a **navoximodu**, jejich výsledky však (až na výjimku kombinace indoximodu s vakcínou proti nádorům prostaty Provenge) byly zklamáním.

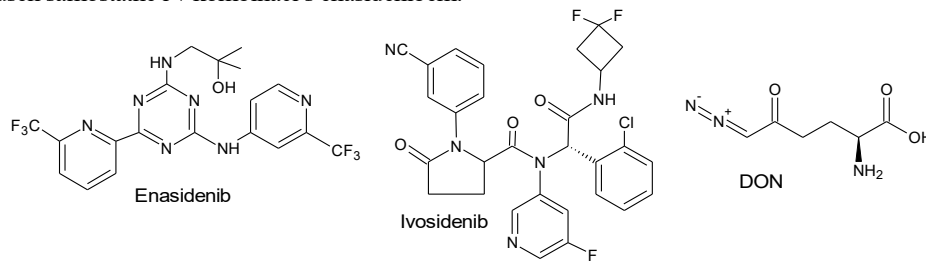


Inhibice metabolismu nádorových buněk

Rychle rostoucí nádorové buňky spotřebovávají více zdrojů energie než buňky normální. Jsou hypoxické, takže na rozdíl od normálních buněk nezískávají energii aerobní respirací, ale převážně glykolýzou. Inhibitory glykolýzy proto mohou brzdit jejich růst stejně jako zamezení přívodu živin vznikem nových cév.

Přestože Warburg spekuloval o zásahu do metabolismu nádorových buněk již před 80 lety, možnost inhibice glykolýzy jako strategie léčby nádorového onemocnění je studována až v posledních letech. Důvodem patrně je vysoká toxicita inhibitorů glykolýzy, která bránila jejich systémovému využití. Nové možnosti aplikace inhibitorů přímo do nádorů mohou tyto problémy překonat. Úspěšné např. byly zkoušky intratumorálního podání **3-brompyrohroznové kyseliny**. Zkoušky jiného jednoduchého inhibitoru glykolýzy, **dichlorooctové kyseliny** přinesly zatím jen rozporné výsledky. U několika pacientů došlo k regresi nádorů, pokračující zkoušky u myši s transplantovanými buňkami lidských nádorů střev však ukázaly, že dichlorooctová kyselina může v některých případech růst nádorů dokonce podporovat. Metabolismus nádorových buněk ovlivňuje orální antidiabetikum **metformin** (N,N-dimethylbiguanid). Nedávné zkoušky prokázaly, že metformin inhibující oxidativní fosforylaci může významně prodloužit život pacientů s pokročilými nádory prostaty, k vyvolání protinádorového účinku jsou však nutné příliš vysoké koncentrace, což zvyšuje riziko vedlejších účinků. Vhodnější má proto být jiný biguanidový derivát IM156 vyvíjený firmou ImmunoMet Therapeutics, jehož klinické zkoušení bylo zahájeno v r. 2017. V srpnu 2017 byl pro léčbu relapsů akutní myeloidní leukemie povolen **enasidenib** (Idhifla, Cegene), což je inhibitor mutované formy isocitrátdehydrogenasy-2 (IDH2), která se vyskytuje v buňkách řady různých nádorů. IDH2 je jedním z enzymů Krebsova cyklu. V mitochondriích katalyzuje oxidativní dekarboxylaci kyseliny isocitronové na kyselinu α -ketoglutarovou. Tu pak ale mutovaná forma redukuje na kyselinu 2-hydroxyglutarovou, čímž negativně ovlivňuje produkci energie (ve formě ATP) v buňkách, biosyntézu aminokyselin, koncentraci NADPH v buňkách, koncentraci hypoxií indukovaného faktoru, jakož i některé epigenetické změny.

Inhibitorem jiné mutované formy isocitrátdehydrogenasy IDH1 s výskytem u 6-10% pacientů s akutní myeloidní leukémií je **ivosidenib**, který je klinicky zkoušen samostatně i v kombinaci s enasidenibem.



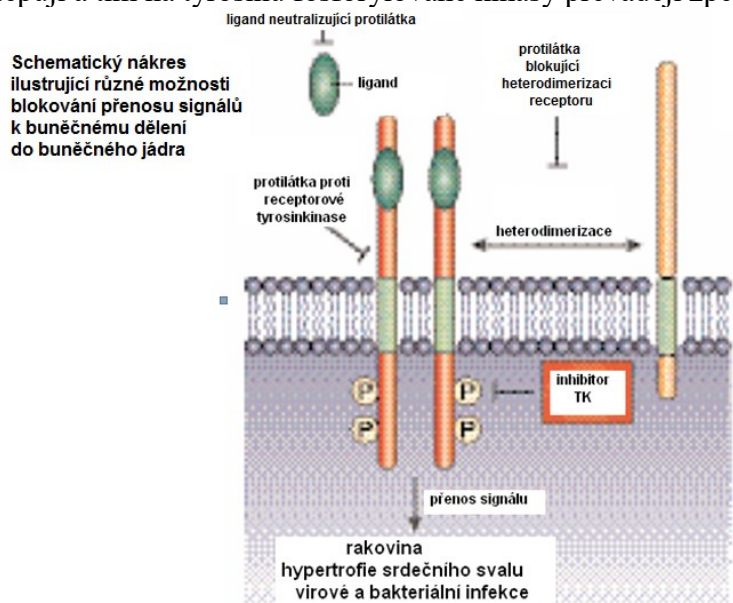
Růstu buněk napomáhá glutamin, který je zdrojem dusíku i uhlíku pro řadu molekul, které jsou stavebními kameny nukleových kyselin a bílkovin. Rychle se dělicí nádorové buňky spotřebovávají glutaminu více než buňky normální. Blokování přísunu glutaminu může růst nádorových buněk potlačovat. Jednou z látek, které takto mohou působit je již v r. 1956 objevený antagonist glutaminu, DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin. Nyní se ukázalo, že DON může překonávat hematoencefalickou bariéru a může proto být užitečný při léčbě glioblastomu, nádoru mozku. Jako zajímavost lze uvést, že některá profarmaka DONu jsou ve spolupráci s americkými vědci studována na ÚChB AV ČR.

Blokování přenosu signálů k buněčnému dělení

Signály k dělení, mitose, předávají buňkám různé **mitogenní látky**, zejména **růstové faktory** svými interakcemi s receptory na povrchu buňky. Uvnitř buňky je signál předáván kaskádou různých aktivačních reakcí až do buněčného jádra.

Z faktorů ovlivňujících růst a dělení buněk byl již zmíněn VEGF. Z dalších prorůstových faktorů, které podporují i růst a dělení buněk patří zejména epidermální růstový faktor (EGF, Epidermal Growth Factor), transformující růstové faktory (TGF- α a TGF- β , Transforming Growth Factor) a insulinu se podobající růstový faktor (IGF, Insulin-like Growth Factor) a od krevních destiček odvozený růstový faktor (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor). Ukázalo se, že na povrchu některých nádorových buněk je nadměrně zvýšeno množství receptorů pro tyto růstové faktory. Interakce těchto růstových faktorů s jejich receptory vyvolává signály k růstu a dělení buněk, To zprostředkovávají proteinkinasy, které jsou spřažené s receptory. Při interakci s receptory jsou uvnitř buňky tyto kinasy aktivovány a začnou fosforylovat hydroxylové skupiny tyrosinu, serinu nebo threoninu v dalších enzymech. Přitom se mění aktivita a někdy i funkce fosforylovaných enzymů, které pak působí na jiné proteiny, až nakonec je signál kaskádou enzymatických reakcí předán až do buněčného jádra, kde jsou nakonec aktivovány enzymy, které přímo řídí replikaci DNA a další procesy provázející růst a dělení buněk. Některé receptorové kinasy dokonce ani nepotřebují k aktivaci žádný vnější signál – jsou aktivní trvale.

Kinasy signalizační dráhy aktivuje fosforylace hydroxylové skupiny tyrosinu. Fosforylace serinových nebo threoninových zbytků naopak může někdy (ale ne vždy) aktivovat fosforylasy, které fosfátové skupiny odštěpují a tím na tyrosinu fosforylované kinasy převádějí zpět do neaktivního stavu.



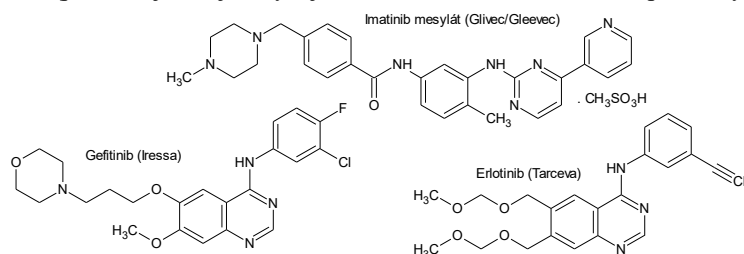
Inhibitory proteinkinasy nebo aktivátory fosforylas blokují přenos signálu k dělení od kinasy receptoru do jádra buňky. Inhibitory tyrosinových proteinkinasy (TKI) působí jako „cílené“ léky především na nádorové buňky, v nichž je kinasová aktivita v důsledku mutací zvýšena nebo které nepotřebují k dělení vnější signály. Jejich účinky na normální buňky jsou tak podstatně menší než u standardních cytostatik.

Inhibitory tyrosinových proteinkinás mívají koncovku –**tinib**, inhibitory serinových a threoninových proteinkinás pouze –**nib**. Podle koncovky v názvu ale nelze vždy inhibitory spolehlivě rozlišit. Inhibitory proteinkinás byly vyvíjeny od 90. let minulého století a pro onkologii tehdy představovaly velký průlom. Prvním inhibitelem zavedeným do protinádorové terapie byl **imatinib** (Gleevec, Novartis), který byl vyvinut pro léčbu chronické myeloidní leukemie (CML). Tu způsobuje přesun genů mezi 9. a 22. chromosomem, při němž dojde ke spojení genů *abl* a *bcr* kódujících bílkoviny s tyrosinkinásou resp. serin/tyrosinkinásou aktivitou. Produktem fúze genů je tyrosinkinasa, která i bez signálu od růstového faktoru trvale aktivuje bílkoviny regulující buněčný cyklus. Buňka s fúzním genem se pak nekontrolovaně dělí. Imatinib se váže do vazebního místa kinasu pro ATP. Přitom inhibuje jen tyrosinkinasu kódovanou *abl-bcr* a dvě další kinasu, aktivitu ostatních proteinkinás neovlivňuje.

Imatinib může sloužit za příklad moderního racionálního přístupu k hledání nových léčiv:

Výzkumníci nejprve zjišťovali, jaké látky mohou tyrosinkinasu kódovanou fúzním genem *abl-bcr* inhibovat. Vodítková látka byla nalezena v jednom derivátu, který měl v poloze 2 pyrimidinového jádra navázanou 3-pyridylovou a v poloze 2 m-aminofenylaminovou skupinu. Pak následovaly modifikace molekuly. Zavedením methylskupiny do polohy 6 benzenového cyklu byla potlačena nežádoucí inhibiční aktivita vůči proteinkinase C, benzoylací aminoskupiny byla zvýšena biologická dostupnost léčiva a zavedením polárního N-methylpiperazinového zbytku zlepšena rozpustnost.

Imatinib byl nejprve povolen pro léčení chronické myeloidní leukemie, pak pro léčbu GIST (gastrointestinálních stromálních tumorů, nádorů zažívacího traktu vycházejících z pojivové tkáně), dnes je schválen pro celkem 10 indikací. Nedávno provedená studie ukázala, že pacienti s chronickou myeloidní leukemií léčení imatinibem, u nichž došlo ke kompletní remisi onemocnění, se dožívají stejného stáří jako ostatní populace (podrobnější údaje o vývoji imatinibu i dalších TKI – viz doprovodný text CML-TKI).



V některých nádorových buňkách je nadměrně zvýšen počet receptorů pro epidermální růstový faktor (EGF). Tyto buňky tak dostávají signály k buněčnému dělení, i když je koncentrace EGF velmi nízká.

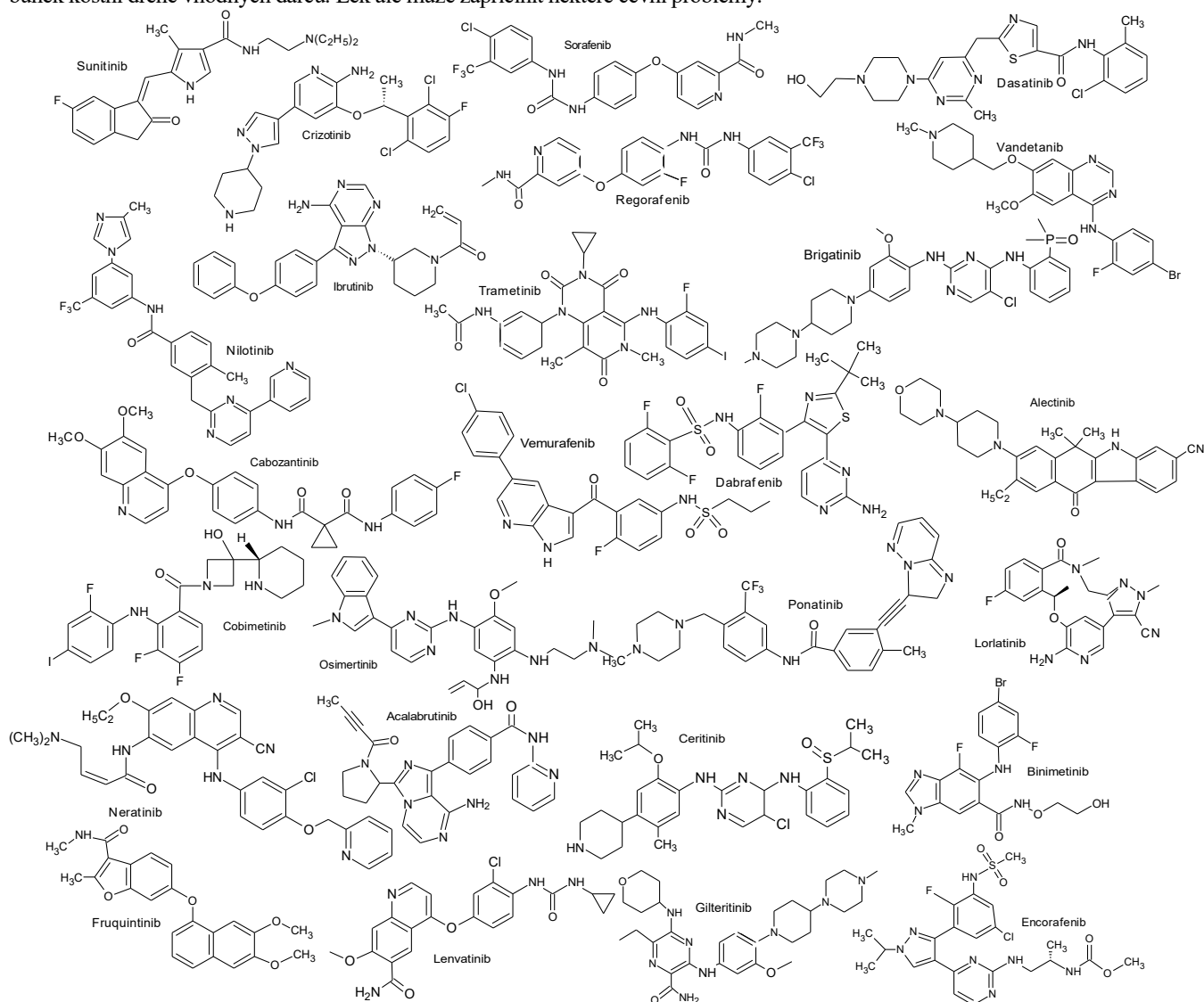
Inhibitor tyrosinkinasy receptoru pro EGF **gefitinib** (Iressa, AstraZeneca) byl v r. 2002 povolen pro léčbu pokročilých stadií nádorů plic v Japonsku a EU, v USA, Kanadě a Švýcarsku je povoleno jeho omezené použití, u pacientů s metastázujícími nádory plic s určitými mutacemi genu *EGFR* se ale dokonce stal lékem první volby. Tyrosinkinasa EGFR je cílovou strukturou i pro **erlotinib** (Tarceva, původně OSI Pharmaceuticals, nyní Roche) povolený v r. 2004 pro léčbu nádorů plic a v r. 2005 také nádorů pankreatu (v kombinaci s gemcitabinem). Když došlo k předčasnému úmrtí několika pacientů léčených gefitinibem, začalo být uplatnění inhibitorů tyrosinkinás receptorů růstových faktorů přísněji posuzováno. Ukázalo se, že ani nová cílená léčiva nejsou zcela bezpečná, jak o nich tvrdila reklama. Jejich přínosy ale stále podstatně převyšují rizika. Nežádoucí vedlejší účinky, ale i nepříjemné dopady žádoucího účinku (blokáda působení růstových faktorů, např. EGF) lze přitom většinou omezit úpravou terapeutického režimu.

Proteinkinasy účastnících se přenosu signálů k buněčnému dělení je řada, další kinasu plní v buňce jiné úlohy. Celkem jich zatím bylo zjištěno 512. Soubor kinas v buňce je někdy nazýván **kinom**.

Počet povolených a klinicky zkušných inhibitorů kinas měl podle jedné studie z konce roku 2017 činit celkem 243. Jsou to především kinasu kódované fúzními geny i další kinasu podílející se na nádorové transformaci a růstu nádorů, často různé mutanty. Léčiva, která interagují s různými kinasami, se ale mohou uplatnit i při léčbě dalších onemocnění.

K první generaci kinasových inhibitorů přibýly v r. 2006 tři další. **Sunitinib** (Sutent, Pfizer) je určen pro léčbu stromálních nádorů GI traktu, zkoušen je u nádorů ledvin, a to i při adjuvantní terapii po vyoperování nemocné ledviny. Zkoušky kombinace erlotinibu se sunitinibem naznačují, že by se tyto léky mohly uplatnit i při léčbě virových onemocnění, jako je horečka dengue nebo infekce virem Zika. **Dasatinib** (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) je duální inhibitor, který kromě tyrosinkinasy kódované fúzním genem *abl-bcr* inhibuje také kinasu Src. Může být používán jak k léčbě chronické myeloidní leukemie (výborné jsou výsledky při léčbě CML dětských pacientů), tak i akutní lymfoblastické leukemie, zkoušen je při léčbě některých sarkomů. Inhibitor serin-threoninové kinasu **sorafenib** (Nexavar, Bayer) blokuje kinasu receptorů pro VEGF i PDGF a také Raf kinasu (to odráží název), která je aktivována produktem onkogenu *Ras*. Je určen k léčbě nádorů ledvin, jater, štítné žlázy, zkoušen byl nebo je u některých dalších nádorů. **Lapatinib** (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline) byl povolen r. 2007 pro léčbu nádorů prsu a plic, zkoušen je u nádorů střev. Je to duální inhibitor, jehož cílovými strukturami jsou tyrosinkinasy spřížené s dvěma typy receptorů pro EGF, mj. receptoru ErbB2 (HER2/neu), který se vyskytuje v nadměrném množství v buňkách nádorů prsu. **Nilotinib** (Tasigna, Novartis), který je určen pro pacienty s chronickou myeloidní leukemií, u nichž se vyvinula rezistence na imatinib, byl povolen rovněž v r. 2007. **Vemurafenib** (Zelboraf, Daiichi-Sankyo, Genentech) potlačuje účinek proteinu kódovaného mutovaným onkogenem *BRAF*, povolen byl v USA v r. 2011 a v Evropě v r. 2012 k léčbě pokročilých stadií melanomu, osvědčil se při léčbě metastázujícími nádory štítné žlázy. V r. 2011 byl povolen i **krizotinib** (Xalkori, Pfizer) inhibující kinasu ALK (anaplastická lymfomová kinasu), která je trvale aktivní u některých nemalobuněčných nádorů plic s fúzním genem *EML4-ALK*. **Brigatinib** (Alunbrig, Takeda) představuje novou generaci inhibitorů kinasu ALK. V druhé polovině roku r. 2017 byl povolen po úspěšném klinickém zkoušení u ALK pozitivních nemalobuněčných nádorů plic nereagujících na krizotinib.

Později byly schváleny další inhibitory ALK **vandetanib** (Zactima nebo Cyprelsa, AstraZeneca) určený k léčbě nemalobuněčných nádorů plic a nádorů štítné žlázy, **pazopanib hydrochlorid** (Votrient, GlaxoSmithKline) – nádory ledvin a vaječníků, sarkomy měkkých tkání, **axitinib** (Inlyta, Pfizer) – nádory ledvin, zkoušen je spolu s protilátkou pembrolizumabem při kombinované léčbě nemalobuněčných nádorů plic a sarkomů měkkých tkání. **Bosutinib** (Bosulif, Pfizer) inhibuje kinasu abl i kinasu src, která je nadměrně exprimována v leukemických buňkách rezistentních na imatinib. Schválen proto byl pro léčbu pacientů s leukemií, kteří přestali reagovat na dosavadní léčbu (článek o záměně isomerů bosutinibu – viz *Chem. listy* **2014**, *108*(1): 3-6). Lékaři z Karlovy univerzity nedávno prokázali v klinických zkouškách, že bosutinib může být využit i u nenádorového onemocnění – může redukovat růst cyst u pacientů s polycystickou chorobou ledvin. **Regorafenib** (Stivarga, Bayer) blokující mj. Raf kinasu i kinasu receptoru pro neurotropní faktor (vyvolává vznik podpůrných buněk nervové tkáně), povolen byl nejprve pro léčbu metastázujících nádorů střev a konečníku, nově pro léčbu stromálních nádorů zažívacího traktu (GIST), úspěšně je zkoušen u nádorů jater a sarkomů měkkých tkání. Jako lék pro léčbu myelofibrozy, onemocnění kostní dřeně, které může postihovat pacienty s různými typy leukemie, byl v r. 2011 povolen také **roxolitinib** (Jakafi, Incyte), inhibitor kinas JAK1 a JAK2. Byl sice neúspěšně zkoušen u nádorů pankreatu a střev, ale pak se uplatnil kromě léčby myelofibrózy i v terapii polycythémie a při transplantacích, očekává se uplatnění v dermatologii a jeho prodeje se blíží ke 2 mld. USD. V závěru roku 2012 byl povolen pro léčbu jednoho typu nádorů štítné žlázy a v r. 2016 k léčbě nádorů ledvin **kabozantinib** (Cometriq/Cabometyx, Exelixis a Ipsen), inhibitor kinasy spřažené s VEGFR a kinasy MET, zkoušen byl se střídavými výsledky u dalších nádorů: neúspěšně u nádorů prostaty, s dobrým výsledkem u nemalobuněčných nádorů plic a sarkomů měkkých tkání. V r. 2012 byl ještě povolen i **ponatinib** (Iclusiq, Ariad) k léčbě chronické myeloidní leukemie způsobené rezistentními mutantami genu *bcr-abl*. Při jeho klinickém zkoušení se ukázalo, že u pacientů s CML rezistentní na imatinib poskytují lepší výsledky než transplantace kmenových buněk kostní dřeně vhodných dárců. Lék ale může zapříčinit některé cévní problémy.



V r. 2013 a 2014 byly povoleny léky GlaxoSmithKline **trametinib** (Mekinist), inhibitor kinasy MEK a **dabrafenib** (Tafinlar) samostatně a pak i ve vzájemné kombinaci nebo i kombinaci s vemurafenibem pro léčbu metastázujících melanomů u pacientů s mutacemi genů *BRAF* a *MEK*. Dabrafenib je zkoušen i při léčbě nádorů štítné žlázy a nádorů mozku u dětí. Listopadu 2013 byl povolen FDA **ibrutinib** (Imbruvica, Pharmacyclics a Janssen Biotech) pro léčbu jednoho vzácnějšího typu lymfomů a v únoru 2014 pro léčbu chronické lymfolytické leukemie, nyní je povolen celkem pro 6 onkologických indikací. Nádorové buňky některých pacientů jsou ale na ibrutinib rezistentní.

Ibrutinib inhibuje enzym nazvaný Brutonova tyrosinkinasa (BTK) tím, že se kovalentně váže na cystein poblíž místa pro vazbu ATP. BTK je jedním z enzymů signalizační dráhy ovlivňující růst a množení maligních B-lymfocytů. Vysoce selektivní inhibitor BTK druhé generace **akalabrutinib** (Calquence, AstraZeneca), začal být zkoušen při léčbě chronické myeloidní leukemie, mnohočetného myelomu, nádorů vaječníků a folikulárního lymfomu a řady dalších nádorových onemocnění v 25 klinických studiích, publikace s výsledky jeho preklinického testování u myšího modelu nádorů pankreatu musela ale být stažena s tím, že obsahuje falsifikované údaje. V listopadu 2017 byl povolen FDA pro léčbu lymfomu z pláštěvých buněk, vzácného (3-10%) typu ne Hodgkinsonských lymfomů. Dalším inhibitorem BTK je čínský **zanubrutinib** (Brukinsa, BeiGene), který americký FDA povolil v listopadu 2019.

Alektinib (Alecensa, Chugai, Roche) byl povolen v r. 2014 v Japonsku, v USA v prosinci 2015. Je inhibitorem kinasy ALK kódované fúzním genem, určen je pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic nereagujících na krizotinib, nově byl povolen i pro dosud neléčené pacienty. Pro stejnou indikaci je určen **ceritinib** (Zykadia, Novartis) povolený v dubnu 2014. Počátkem roku 2015 byl pro léčbu nádorů štítné žlázy (poskytuje lepší výsledky než léčba radiojodem) a v r. 2016 pro léčbu pokročilých stadií nádorů ledvin v kombinaci s everolimem povolen **lenvatinib** (Levima, Eisai), inhibitor kinas spřažených s receptory EGF; pozitivní výsledky přineslo i jeho srovnání se sorafenibem při léčbě nádorů jater a byla podána žádost o jeho povolení pro tuto indikaci. Nově je při léčbě pokročilých stadií nádorů ledvin zkoušena jeho kombinace s protilátkou pembrolizumabem.

Postupně se uplatňují inhibitory 3. generace, které cílí na rezistentní nádory se specifickými mutacemi genů. **Kobimetinib** (Cotellic, Genentech) byl povolen v USA v listopadu 2015 pro léčbu metastázujících melanomů s určitými mutacemi genu *BRAF*, používá se v kombinaci se vemurafenibem, zkoušen je v kombinaci s vetentoklaxem. V listopadu 2015 byl pro léčbu pokročilých nádorů plic rezistentních na dosavadní léčbu povolen **osimertinib** (Tagrisso, AstraZeneca), inhibitor EGFR třetí generace, který interaguje s nežádoucími mutacemi EGFR, ne však s jeho normální formou. **Afatinib** (Gilotrif, Boehringer Ingelheim) inhibuje mutantní kinasy spřažené s EGFR, na které nepůsobí erlotinib a gefitinib. Brzdí rozvoj nádorů plic, ale neprodlužuje přežití pacientů, zkouší se u pokročilých nádorů prsu, povolen byl zprvu v Německu, v r. 2013 i v USA. Duálním inhibitorem je v r. 2017 povolený **neratinib** (Nerlynx, Puma Biotechnology) blokující kinasy receptorů HER2 a EGFR. Jeho klinické zkoušení přineslo dobré výsledky při léčbě metastázujících nádorů prsu, zejména při potlačování metastáz v mozku, zkoušeny jsou i jeho kombinace s jinými protinádorovými léčivy. V r. 2018 byl soubor povolených inhibitorů proteinkinasy rozšířen o několik dalších. K léčbě neoperabilního metastázujícího melanomu je určena kombinace **binimetinibu** (Mektovi, Array Pharma) s inhibitorem serin-theroninové kinasy **enkoraftinibem** (Braftovi, Array Pharma). Kombinace blokuje dva klíčové enzymy BRAF a Mek signalizační dráhy onkogenu *ras*. Inhibitorem nové generace je **dakomitinib** (Vizimpro, Pfizer), který blokuje kinasu spřaženou s EGFR, u nádorů plic je účinnější než erlotinib nebo gefitinib. Inhibitorem kinas ALK a ROS1 je **lorlatinib** (Lorbrena, Pfizer) který je schopen překonávat hematoencefalickou bariéru povolený pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic s metastázemi v centrálním nervovém systému. Zajímavým inhibitorem je **larotrektnib** (Vitakvi, Bayer, vyvíjený ve spolupráci s Loxo Oncology jako LOXO-101) povolený na konci roku 2018 jako „tkáně nerozpoznávající“ (tissue-agnostic) selektivní inhibitor kinasy neurotrofního receptoru tropomyosinu (*NTRK*), faktoru stimulujícího vývoj neuronů při embryogenezi. Při dalším vývoji není gen *NTRK* přepisován. Může však fúzovat s jiným genem, což pak má za následek tvorbu trvale aktivní receptorové kinasy, která pak spouští signalizační kaskádu podporující proliferaci nádorových buněk. Přítomnost fúzního genu *NTRK* byla zjištěna v řadě různých nádorů dospělých i dětských pacientů pomocí moderních genetických testů. Larotrektnib pak může být použit k jejich léčbě, bez ohledu na jejich typ a místo výskytu. Pro léčbu pacientů rezistentních na larotrektnib je vyvíjen přípravek LOXO-195. V r. 2018 byl ještě povolen **gileritinib** (Xospata, Astellas Pharma), který je určený pro léčbu pacientů s akutní myeloidní leukemií spojenou s mutací genu pro receptorovou kinasu *FLT3*. Mutace se vyskytuje u asi 30% pacientů s AML a vede k fatálnímu průběhu onemocnění. V Číně byl v r. 2018 povolen **frukvintinib** (fruquintinib, Elunete), inhibitor kinas spřažených se všemi třemi formami VEGFR, který podstatně zvyšoval přežití pacientů s pokročilými stadii léčbu nádorů střev a konečníku. Při zkouškách léčby nádorů plic ale selhal. **Cediranib** (Recentin, AstraZeneca) blokuje receptor pro VEGF, ale ukazuje se, že by mohl zamezit i homologii řízený proces opravy poškozené DNA. Jeho první klinické zkoušky nebyly úspěšné, úspěšné výsledky ale byly dosaženy v kombinaci s olaparibem blokujícím opravy DNA jiným mechanismem. Z klinicky zkoušených inhibitorů stojí dále za zmínku **bafetinib**, duální inhibitor blokující kinasy bcr-abl a lyn, který má statut „léku sirotku“ pro léčbu rezistentních leukemií, zkoušen je i u nádorů mozku. Jiným Určitou komplikací pro jeho použití je, že vyvolává průjemy. Kinasu src blokuje i **sarakatinib**. **Telatinib** inhibující kinasy VEGFR2, PDGFR a KIT receptoru má léčit metastázující nádory žaludku. Inhibitorem kinas receptorů VEGFR1-3 je **tivozanib** (Fotivda). Ten byl určen zejména pro léčbu metastázujících nádorů ledvin, nebyl zprvu povolen, ale v r. 2017 jej schválila EMA. Ve srovnání se sorafenibem neprodlužoval život pacientů, měl však menší vedlejší účinky. Zkoušen byl i v kombinaci s protilátkou nivolumabem opět u pokročilých nádorů ledvin Výsledky jeho klinických zkoušek u nádorů střev a konečníku nebyly úspěšné. Novými inhibitory jedné mutované formy kinasy receptoru EGFR s vloženým exonem 20 (EGFR exon 20 insertion) jsou **tarloxitinib** a **poziotinib**, které by měly být vysoce selektivními léky pro nádory plic s touto mutací. Tarloxitinib je profarmakem, které je aktivováno pouze v nádorové tkáni, která je hypoxická. **Ikotinib** a **anlotinib**, kinasové inhibitory vyvíjené v Číně, blokují v buňkách nádorů plic kinasu spřaženou s EGFR podobně jako erlotinib a gefitinib. Kinasu receptoru pro EGF blokují i **kvizartinib** (quizaritinib, léčba akutní myeloidní leukemie) a **varlitinib**. Ten kromě kinasy EGFR inhibuje i další receptory z rodiny HER. Při zkouškách léčby pokročilých stadií nádorů prsu vykazoval lepší výsledky než lapatinib, zkoušen je i u nádorů žlučových, žaludku, střev a konečníku. Novým inhibitorem kinasy receptoru HER2 je **tukatinib**, který je zkoušen při léčbě pokročilých stadií nádorů prsu a měl by být zkoušen i u nádorů střev. Kinasu ALK, kinasy A, B a C receptoru pro tropomyosin (*TRK A-C*) a produkt fúzovaného genu ROS-1 inhibuje **entrektnib** (Rozlytrek, Roche), který byl v srpnu 2019 povolen pro léčbu metastázujících nádorů plic s fúzním genem a je zkoušen u nádorů střev a konečníku a dětského neuroblastomu. **Tivantinib**, inhibitor kinasy c-MET, která je v nádorových buňkách trvale aktivní, byl neúspěšně zkoušen v kombinaci s erlotinibem u nádorů jater, střev a nemalobuněčných nádorů plic. **Selumetinib** (AZD6244, AstraZeneca), inhibitor MAPKK1 a MAPKK2, kinas mitogeny aktivované proteinkinasy byl neúspěšně zkoušen při léčbě nádorů vaječníků, melanomu a nemalobuněčných nádorů plic a nakonec byl povolen jen jako lék „sirotek“ pro léčbu nádorů štítné žlázy rezistentních k radiojodu.

Při léčbě mesotheliomu, nádorového onemocnění plic způsobeného vdechováním asbestových vláken je zkoušen **defaktinib** inhibující kinasu FAK odpovědnou za vznik nádoru. **Fedratinib** (Inrebic, Celgene, nyní BMS) je podobně jako ruxolitinib inhibítorem Janusovy kinasu JAK, která se účastní přenosu signálu předávaného cytokiny interakcí s jejich receptory. Povoleno byl v srpnu 2019 pro léčbu myelofibrosy, onemocnění kostní dřeně. Klinické zkoušky fáze III jiného inhibítora JAK **pakritinibu** vyvinutého v Singapuru byly pozastaveny, když jeden z pacientů zemřel po nitrolebečním krvácení. Další inhibitor Janusovy kinasu upadacitinib (Rinvoq, AbbVie) byl povolen v srpnu 2019, ne však pro použití v onkologii, ale pro léčení reumatoidní artritidy. Receptor pro kolonie stimulující faktor CSF1R blokuje **pepidartinib** (Turalio, Daiichi a Plexxicon), který byl v srpnu 2019 povolen pro léčbu vzácného typu nádoru postihujícího šlachové pouzdro. V r. 2019 byl ještě povolen kinasový inhibitor **erdafitinib** (Balversa, Janssen) určený pro terapii pokročilých nebo metastázujících nádorů močového měchýře s mutovanými formami receptoru pro fibroblastové růstové faktory FGFR 2 a 3. Zahájeno bylo klinické zkoušení **asciminibu (ABL001)**, který je alosterickým inhibítorem kinasu kódované řízním genem *Bcr-Abl1*. Na rozdíl od imatinibu a některých dalších inhibitorů této kinasu se ale neváže do aktivního, ale alosterického místa enzymu, což má umožnit překonání rezistence způsobené mutacemi řízního genu. Nový vysoce selektivní inhibitor kinasu MET **savolitinib** je zkoušen při léčbě metastázujících nádorů ledvin a v kombinaci s gefitinibem nebo osimertinibem u nemalobuněčných nádorů plic. Mutovanou formu receptoru pro fibroblastový růstový faktor 3 (FGFR3) blokuje **infigratinib**, který je zkoušen při léčbě nádorů žlučododu a překvapivě i při potlačování příčin trpasličího vzrůstu u dětí. Jiným inhibítorem kinasu spřažené s mutovanou formou FGFR je **derazantinib**, který je rovněž určen pro léčbu nádorů žlučododu – intrahepatického cholangiokarcinomu, pro niž získal statut „léku sirotku“. Řada dalších vyvíjených inhibitorů receptorových proteinkinas nebo dalších enzymů signalizačních drah je klinicky zkoušena. Pro léčbu mastocytomu, nádorového onemocnění psů, byl povolen **toceranib fosfát** (Palladia, Pfizer), inhibitor kinasu KIT, který spolu s **masitinibem** (Kinavet resp. Masivet, AB Science) s podobnou inhibiční aktivitou patří mezi ojedinělé protinádorové léky určené pro veterinární lékařství, oba jsou ale zkoušeny i v humánní onkologii. Probíhá klinické zkoušení několika desítek dalších nových inhibitorů (viz: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials>)

Pojem cílená terapie je někdy vysvětlován tak, že léčiva této kategorie ovlivňují jen procesy probíhající v nádorových buňkách. I když jsou inhibitory proteinkinas selektivnější než klasická cytostatika, ani ony nejsou prosté vedlejších účinků a vykazují v různé míře orgánovou toxicitu. Časté jsou i cévní problémy. Další nepříjemností je, že jejich účinnost je silně ovlivňována lékovými interakcemi.

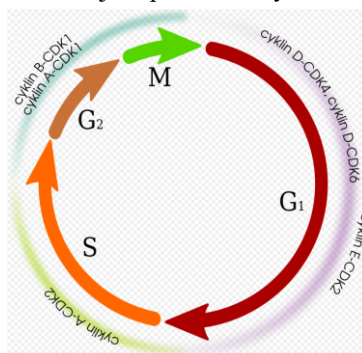
Bylo zjištěno, že u 63% pacientů léčených imatinibem zvyšovaly lékové interakce vedlejší účinky přípravku, u 43% snižovaly jeho účinnost. Inhibitory proteinkinas by proto neměly být předepisovány současně s inhibitory protonové pumpy (léky proti žaludečním vředům), steroidními přípravky, blokátory kalciových kanálů snižujícími krevní tlak, některými antibiotiky a fungicidy.

Velkým problémem je i poměrně rychlý vznik rezistence nádorových buněk na TKI, způsobený tím, že si buňky často nahradí zablokovanou dráhu pro přenos signálů k dělení jinou signalizační dráhou.

Inhibitory proteinkinas regulujících buněčné dělení

Důležitou skupinu proteinkinas tvoří cyklin-dependentní proteinkinasy (cdk), které regulují cyklus buněčného dělení. **Inhibitory cyklin-dependentních proteinkinas** mohou proces buněčného dělení zastavit nebo alespoň zpomalit. Jejich účinkem přitom nejsou nijak ovlivněny funkce nedělicích se buněk v klidovém stavu. Inhibitory obvykle inhibují několik typů cdk současně.

Buněčný cyklus je souborem procesů, které vedou ke zdvojení genetického materiálu a jeho následnému rozdělení do dvou dceřiných buněk. Ke zdvojení DNA dochází v tzv. syntetické fázi označované jako S, k oddělení dceřiných buněk v mitotické fázi M. Mezi těmito fázemi jsou přestávky označované jako G1 a G2 (G od *gap* = mezera). Buněčný cyklus tak je opakující se sled fází G1 – S – G2 – M. Fáze G1, kdy se buňky nedělí, může být velmi dlouhá (někdy se proto přestávka mezi M a S fází rozděluje na G0 a G1 fázi). K dělení pak dojde, až k tomu buňka dostane vhodný signál. Některé diferencované tkáňové buňky se již dále dělit vůbec nemohou a zůstávají trvale v klidovém stavu, který je někdy označován jako postmitotický stav.

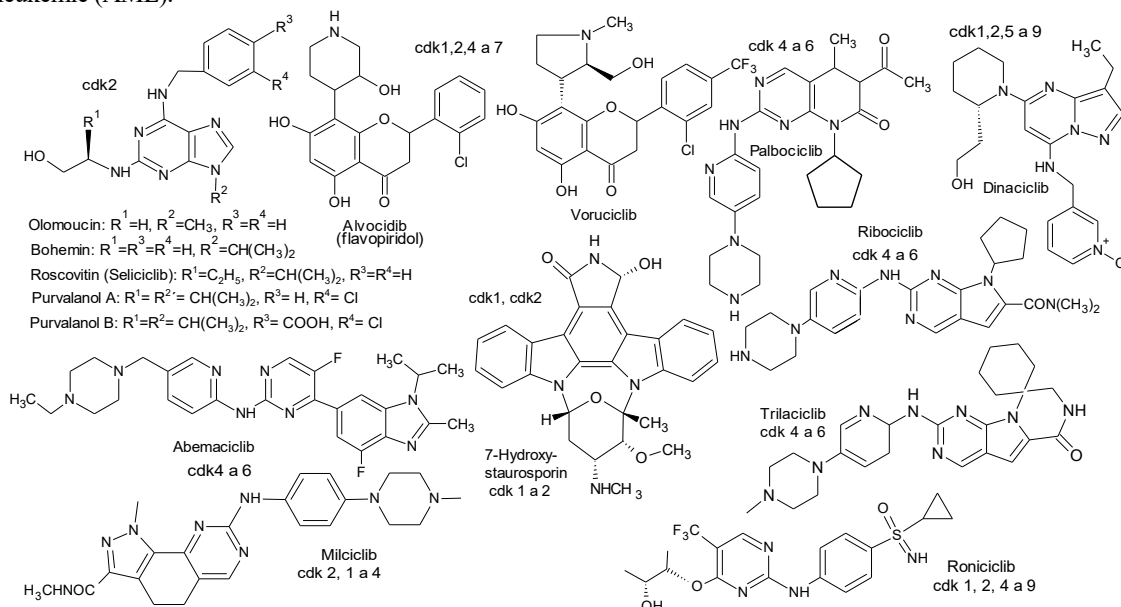


U dělicích se buněk řídí průběh buněčného cyklu bílkoviny nazvané **cykliny**, jejichž koncentrace v buňce se v různých fázích buněčného cyklu mění. Cykliny jsou nezbytné pro aktivaci **cyklinindependentních kinas (cdk)**, které pak fosforylací aktivují další bílkoviny.

Cyklindependentních kinas je (podobně jako cyklinů) několik typů. Kromě regulace buněčného cyklu, čehož se účastní pět známých cdk, ovlivňují tyto enzymy i průběh transkripce a zpracování mRNA i diferenciaci nervových buněk. Pro řízení buněčného cyklu jsou důležité zejména cdk2, cdk4 a cdk6. Kinasa cdk2 je aktivována cyklinem E, který je buňkou syntetizován na konci fáze G1. Aktivace zahajuje fázi S, kdy se spolu s genetickým materiálem syntetizuje i cyklin A. Ten pak vytváří s cdk2 komplex zodpovědný za průběh fáze G2. Regulaci fáze G1 buněčného cyklu řídí cdk4 a cdk6. V této nejdělnější části buněčného cyklu je zajišťován růst dceřiných buněk vzniklých dělením – vznikají zásoby stavebních kamenů důležitých biopolymerů, tvoří se mRNA a jsou syntetizovány nezbytné enzymy, růstové faktory i strukturní bílkoviny, roste množství ribosomů, mitochondrií i dalších buněčných organel.

Inhibitorům cdk se před časem dostalo značné publicity v českých médiích, protože na počátku studia jednoho typu inhibitorů s purinovým skeletem stáli vědci z olomoucké filiálky Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Ti při studiu analogů rostlinného růstového hormonu 6-benzylaminopurinu zjistili, že některé deriváty purinu růst buněk nestimulují, ale naopak potlačují. Příčinou byla inhibice cdk2. První účinná látka z této skupiny, 6-benzylamino-2-(2-hydroxy-ethyl)-9-methylpurin, byla nazvána **olomoucin**, pak byl připraven jiný purinový inhibitor, který byl nazván **bohemín**. Tyto látky se ale v terapii neuplatnily. Při dalším studiu purinových inhibitorů cdk2 prováděném olomouckými pracovníky ve spolupráci s jejich francouzskými kolegy z města Roscoffu byl připraven **roskovitin**, později přejmenovaný na **seliciklib** (Cyclacel), který vedle cdk2A i cdk2B inhibuje i cdk5, 7 a 9. Seliciklib byl nebo je klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu, nádorů prsu, plic i některých neoplastických zánětlivých onemocnění (reumatoidní artritida, cystická fibróza, infekce viry HIV a Herpes simplex), kromě samostatného použití je zkoušen i v kombinaci se sapacitabinem. V USA byl s využitím postupů kombinatoriální syntézy (viz Farm03) připraven rozsáhlý soubor purinových inhibitorů cdk, z nichž **purvulanol B** měl při pokusech *in vitro* o tři řády vyšší účinnost než olomoucin, o něco méně účinný méně polární **purvulanol A** ale lépe pronikal do buněk. I když roskovitin byl prvním klinicky zkoušeným inhibitorem, jako léčiva se inhibitory cdk2 zatím neuplatily.

V terapii byly podstatně úspěšnější inhibitory cyklindependentních kinas cdk4 a cdk6. U těch se překvapivě ukázalo, že kromě blokady buněčného dělení podporují v boji s nádory imunitní systém. Přitom jednak zvyšují počet nádorových antigenů na povrchu nemocných buněk, které slouží cytotoxickým T lymfocytům jako signál k zásahu, jednak snižují počet regulačních T-lymfocytů, které zásah brzdí. Do skupiny těchto inhibitorů patří **palbociklib** (Ibrance, Pfizer), který byl jako první ze skupiny inhibitorů cdk4/6 povolen pro terapii. Byl nebo je úspěšně zkoušen v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy u různých typů nádorů. Na základě zkoušek kombinace s letrozolem byl v únoru 2015 povolen jako průlomová terapie pokročilých stadií nádorů prsu s pozitivním nálezem estrogenních a negativním nálezem HER2 receptoru, v únoru 2016 bylo povoleno použití v kombinaci s fulvestrantem. Účinný má být i při léčbě akutní myeloidní leukemie (AML).

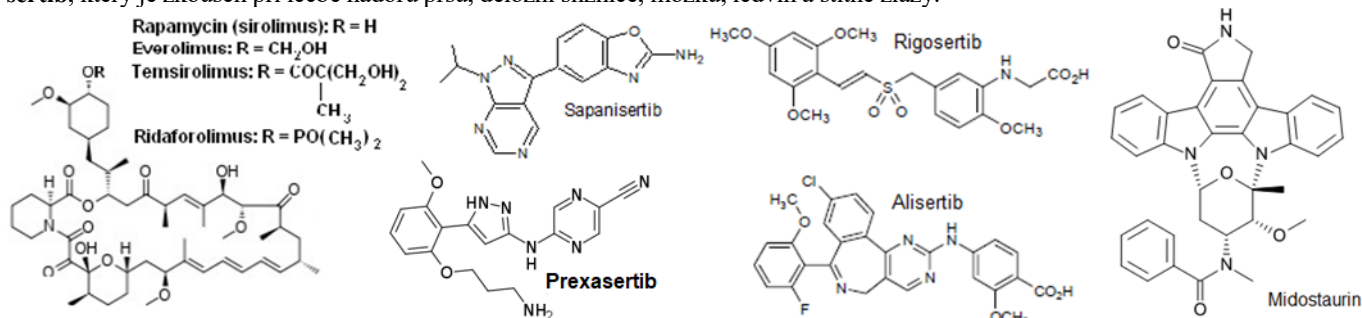


Dalšími inhibitory cdk4/6 jsou i **ribociclib**, **abemaciclib** a **trilaciclib**. Ribociclib (Kisqali, Novartis), byl v r. 2017 povolen v kombinaci s letrozolem. Kombinace výrazně prodlužovala dobu do progresu pokročilých stadií nádorů prsu, její předností jsou dobré výsledky léčby nádorů prsu u mladých žen. Úspěšné zkoušky abemaciclibu (Verzenio, Eli Lilly) v kombinaci s fulvestrantem, opět u metastázujících nádorů prsu byly v r. 2017 dokončeny a kombinace byla v září 2017 povolena. Zkoušky léčby nádorů plic naopak úspěšné nebyly, erlotinib poskytoval lepší výsledek než abemaciclib. Trilaciclib chrání hematopoietické kmenové buňky kostní dřeně. Při léčbě nádorů plic bylo zkoušeno jeho podávání předcházející před topotekánem, výsledky ale byly sporné. Při zkouškách léčby metastázujících nádorů prsu s negativním nálezem estrogenních, progesteronových a HER2 receptorů dodání trilaciclibu k chemoterapeutikům podstatně zvyšovalo dobu přežití pacientek. Flavonoid **alvociclib** (předtím nazývaný flavopiridol), látka pocházející z indické léčivé rostliny, nyní ale připravovaná synteticky, inhibuje cdk 1, 2, 4, 7 a 9. Byl vůbec prvním inhibitorem cdk, který byl povolen (2014), a to jako „lék sirotek“ pro léčbu akutní myeloidní leukemie. Zkoušen je ale i v dalších indikacích.

Příbuzný flavonoid **voruciklib** je klinicky zkoušen ve fázi I. **7-Hydroxystauroporin** inhibuje cdk1 a 2 i několik dalších proteinkinas. Je to syntetický derivát antibiotika staurosporinu, který sám má protinádorovou účinnost, ale je příliš toxický. 7-Hydroxystauroporin byl zkoušen v kombinaci s cisplatinou při léčbě pokročilých stadií různých nádorových onemocnění. Několik cdk (1,2,5 a 9) inhibuje **dinaciklib** zkoušený při léčbě chronické lymfocytické leukemie a nádorů pankreatu. Inhibitory cdk12 v kombinaci s látkami bránícími opravě poškozené DNA by mohly být účinnou léčbou Ewingova sarkomu, rakoviny kostí u dětí a cdk12 je proto v poslední době věnována zvýšená pozornost. Klinicky je zkoušeno ještě nejméně 6 dalších inhibitorů cdk, další jsou vyvíjeny, na jejich výzkumu se podílejí i pracovníci řady českých výzkumných institucí.

Regulátorem buněčného cyklu je také **kinasa mTOR**. Ta ovlivňuje produkci cyklinu D1 a tím i aktivitu cyklindependentních kinas cdk4 a cdk6. Její role v regulaci buněčného dělení je však širší, protože vedle produkce cyklinu D1 kontroluje i přísun živin do buněk a řídí nedostatkem kyslíku vyvolanou tvorbu podjednotek faktorů HIF-1 α a HIF-1 β .

V buňkách normálních prokrvených tkání jsou podjednotky hypoxií indukovaného faktoru HIF rychle inaktivovány von Hippel-Linauovým tumorsupresorem (VHL), který však v některých hypoxických nádorových tkáních chybí. HIF se tam pak kumuluje a stimuluje tvorbu vaskulárního růstového faktoru a dalších faktorů řídicích vznik nových krevních a lymfatických cév. Inhibitory kiny mTOR proto jednak brzdí buněčné dělení nádorových buněk, jednak mají i antiangiogenní vlastnosti. Zvyšují účinek jiných léčiv i radioterapie, při radioterapii chrání zdravé kmenové buňky. Jejich nevýhodou je určitá kardiotoxicita. Prvním léčivem z této skupiny bylo makrolidové antibiotikum **rapamycin** později přejmenované na **sirolimus** (kinasa mTOR byla nazvána podle toho, že je cílovou strukturou pro rapamycin – mTOR = mammalian Target Of Rapamycin). Ten sice byl úspěšně zkoušen i v protinádorové terapii, ale uplatnění našel hlavně při transplantacích jako imunosupresant. V onkologické terapii se spíše používají ethery a estery rapamycinu: **everolimus** (Afinitor, Novartis) schválený v r. 2011 pro léčbu nádorů pankreatu a **temsirolimus** (Torisel, Pierre Fabre/Wyeth), který byl povolen již v r. 2007 pro léčbu pokročilých stadií nádorů ledvin. V 5 onkologických indikacích byl zkoušen **ridaforolimus** (dříve deforolimus, Ariad a Merck), ten však výbor pro nová léčiva FDA nedoporučil s tím, že jeho vedlejší účinky převažují nad přínosy. Novým inhibitorem kiny mTOR s mnohem jednodušší strukturou je **sapanisertib**, který je zkoušen při léčbě nádorů prsu, děložní sliznice, mozku, ledvin a štítné žlázy.



Kinasy Plk (Polo-like kinase) jsou serin/threoninové kiny podobající se kinase Polo mušky octomilky, které řídí přechod z fáze buněčného cyklu G2 do mitotické fáze a její průběh.

Plk jsou exprimovány v rostoucích a dělících se buňkách embryonálních tkání a nádorů, v buňkách zdravých dospělých tkání nejsou až na výjimky (buňky kostní dřeně, vaječníky, varlata) aktivní. Inhibitorem Plk (a rovněž i fosfatidylinositol 3 kiny, PI3K) je **rigosertib**, který je zkoušen při léčbě nádorů pankreatu (v kombinaci s gemcitabinem) a také myelodysplastického syndromu – poškození buněk kostní dřeně, které se projevuje mimo jiné poruchou tvaru a funkčnosti krvinek, anemií a leukemií. Inhibitorem několika kinas, zejména receptorové kiny FLT3, je **midostaurin** (Rydapt, Novartis), polosyntetický derivát staurosporinu produkovaného *Streptomyces staurosporeus*, který byl v r. 2017 povolen pro léčbu akutní myeloidní leukemie.

Další kinasou, která reguluje buněčné dělení, je serin/threoninová **Aurora kinasa A (AURKA)**, která řídí oddělení chromatid při dělení buněk.

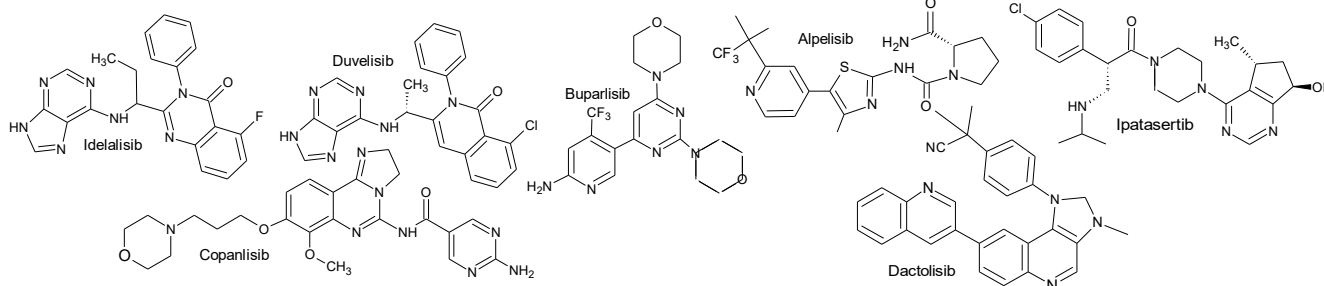
Inhibitorem AURKA je **alisertib**, klinicky zkoušený při léčbě vzácnějšího typu lymfomu. Po slibné fázi II selhal ve fázi III, pokračovalo ale jeho zkoušení u nemalobuněčných nádorů plic a ne Hodgkinsonských lymfomů.

Značný význam pro hladký průběh buněčného dělení mají tzv. kiny kontrolních bodů (checkpoint kiny) Chk1 a Chk2, serin-threoninové kiny, které mají důležitou úlohu v regulaci buněčného cyklu

Kinasa Chk1 je ve spolupráci s dalšími kinasami ATR a ATM jakýmsi monitorem poškození DNA. Poškozením DNA jsou aktivovány kiny ATR (jednořetězové oblasti DNA) nebo ATM (dvouřetězové zlomy), které fosforylací aktivují kinasu Chk. Ta v aktivovaném stavu pozastavuje přechod z fáze G2 do mitotické fáze do doby než buněčné mechanismy poškozenou DNA opraví. Není-li DNA opravena, je dělení zastaveno a dochází k buněčné smrti. Inhibitory Chk1 tak představují další možnost jak zastavit nádorové bujení. Několik inhibitorů Chk1 je v různých stadiích vývoje, nejdále pokročil vývoj **prexasertibu**, který je klinicky zkoušený při léčbě nádorů vaječníků rezistentních na platinová cytostatika a malobuněčných nádorů plic.

Při buněčném růstu, dělení, proliferaci a přežívání buněk mají významnou roli i **fosfoinositid-3-kinasy** (fosfatidylinositol-4,5-difosfát-3-kinasy, PI3K), které jsou klíčovou komponentou buněčné signalizace.

PI3K často mutují, což vede k jejich zvýšené aktivitě. Mutovaná hyperaktivní δ isoforma PI3K se vyskytuje v B-lymfocytech při hematologických malignitách – leukemii a lymfomech, jiná mutanta u nádorů prsu je spojena se špatnou prognózou. Inhibitory kinas PI3K mají v názvu koncovku –lisib. Účinným inhibítorem PI3K δ je **idelalisib** (Zydelig, GS-1101, Gilead), který se osvědčil při zkouškách terapie relapsující nebo jiné léčbě odolávající chronické lymfocytické leukemie a některých typů lymfomů, a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s bendamustinem nebo rituximabem. V r. 2014 byl pro tyto indikace povolen, po výskytu závažných vedlejších účinků a dokonce úmrtí jednoho pacientů ale FDA a EMA vydaly varování před jeho použitím u dosud jinak neléčených pacientů, v ostatních případech ale jeho přínosy mají převládat nad riziky. Po úspěšném zkoušení při léčbě folikulárních lymfomů byl jako lék 3. volby v září 2017 pro tuto indikaci povolen **kopanlisib** (Aliqopa, Bayer). Dalším inhibítorem PI3K δ je **umbralisib** zkoušený při léčbě různých hematologických malignit. **Duvelisib** (Copiktra, Verastem), který inhibuje vedle PI3K δ i isoformu PI3K γ byl v r. 2018 schválen pro léčbu dvou typů nehodgkinských lymfomů neragujících na předchozí léčbu. Kromě onkologických onemocnění byl testován i při léčbě astmatu a reumatoidní artritidy, jeho přínosy ale byly sporné. **Buparlisib** inhibuje všechny 4 isoformy PI3K (α , β , γ a δ) je na rozdíl od předchozích inhibitorů určen pro léčbu pokročilých stadií nádorů prsu, při nichž je zkoušen v kombinacích s různými dalšími léky. V podobné indikaci byly nebo jsou zkoušeny další inhibitory PI3K **alpelisib** a **daktolisib** (ten inhibuje i kinasu mTOR).



Kinasy PI3K aktivují fosforylací jinou serin/threoninovou kinasu Akt, která řídí metabolismus a přežívání buněk tím, že indukuje proteosyntézu a inhibuje apoptické procesy.

Inhibitory kinas Akt tak mohou zastavovat růst nádorových buněk. Patří mezi ně **miltefosin** a neúspěšně zkoušený **perifosin** zmíněné v předchozí přednášce a nový inhibitor **ipatasertib**, který v kombinaci s paklitaxelem prodlužuje dobu do progresu nádorového bujení u pacientek s pokročilými stadii nádorů prsu s trojnásobně negativním nálezem receptorů (estrogenních, progesteronových i HER2), což znamená, že nereagují na hormonální léčbu ani na léčiva blokující HER2 jako je trastuzumab (Farm 12). Novým inhibítorem Akt a také kinas a také extracelulárními signály regulované kinas ERK (mitogeny aktivované proteinkinasy) je **ONC201**, který může překonávat hematoencefalickou bariéru a jehož klinické zkoušky byly zahájeny v r 2017.

Inhibitory prenylace

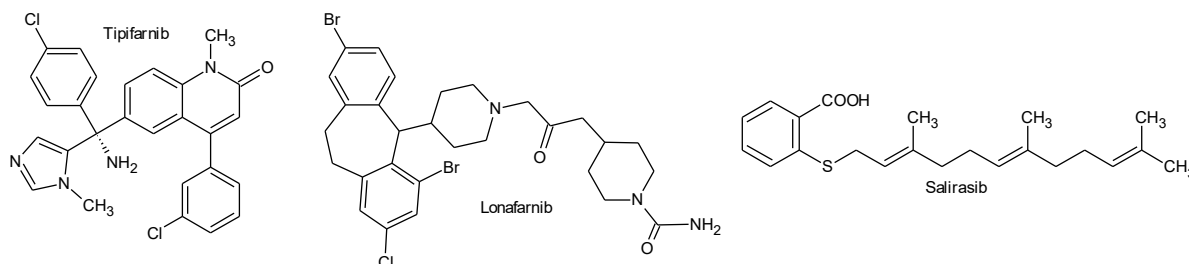
Řada bílkovin regulujících buněčný růst, diferenciaci a dělení obsahuje v aktivním stavu GTP, neaktivní forma GDP. Při regulaci buněčného dělení hrají významnou roli tři protoonkogeny *ras*. Produkty jejich transkripce, proteiny *ras*, jsou malé enzymy hydrolyzující GTP. Působí tak jako spínače mezi aktivním a neaktivním stavem regulačních bílkovin. Mutací genů *ras* vznikají onkogeny, jejichž transkriptem je protein, který už nemůže GTP hydrolyzovat. Signalizační kaskáda tak zůstává trvale zapnutá.

Protein RAS sám jako takový není aktivní. Není však aktivován fosforylací jako jiné bílkoviny signalizační kaskády, ale prenylací, navázáním nenasyceného alifatického řetězce s isoprenoidní strukturou. Může jít buď o farnesylyaci, kdy se na protein *ras* navazuje řetězec C_{15} nebo geranylyaci, kdy se váží řetězec C_{20} tvořený 4 isoprenoidními jednotkami. Prenylace umožňuje zakotvení proteinu *ras* v buněčné membráně, což je podmínkou jeho účinnosti.

Inhibitory farnesyltransferasy blokují aktivaci proteinů *ras*, a to jak produktů exprese nativního genu *ras*, tak i mutovaných forem a tím brání přenosu signálu pro buněčnou proliferaci. Nezávisle na mutacích genů *ras* mohou tyto inhibitory zvyšovat náchylnost nádorových buněk k buněčné smrti, apoptóze, tím, že ovlivňují tvorbu důležité proapoptotické bílkoviny, „receptoru smrti“ DR5 (death receptor 5).

Farnesyltransferasu inhibují některá léčiva používaná v terapii jiných onemocnění, např. lovastatin, látka sloužící ke snižování hladiny cholesterolu, nesteroidní protizánětlivé léčivo sulindak sulfid a některé přírodní látky, jako je limonen. Cíleně pro léčbu rakoviny bylo připraveno několik účinných selektivních syntetických inhibitorů, které ale zatím nebyly úspěšné. Nejdále pokročilo zkoušení **típi-farnibu** (Zarnestra, Johnson & Johnson) při léčbě hematologických malignit, nádorů hlavy a krku a dalších nádorových indikacích. V r. 2005 ale byla žádost o jeho povolení pro léčbu AML u pacientů starších 65 let zamítnuta FDA, v r. 2015 ale byl zájem o tento inhibitor obnoven. Zkoušení **lonafarnibu** (Sarasar, Schering-Plough) při léčbě nemalobuněčných nádorů plic bylo zastaveno, avšak klinické zkoušky léčby jiných nádorů a leukemie pokračovaly. Nakonec byl lonafarnib povolen v neonkologické indikaci – jako lék pro léčbu virové hepatitidy σ a pro léčbu progerie – vzácné smrtelné nemoci dětí se znaky předčasného stáří.

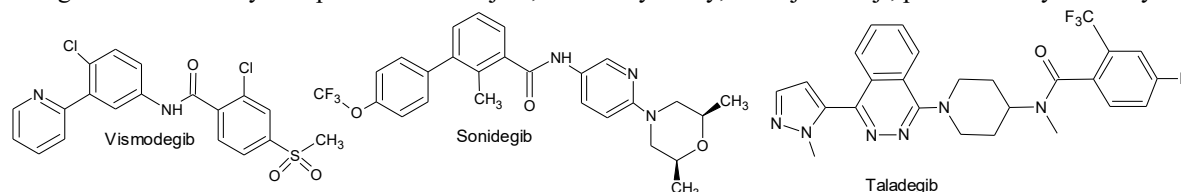
Nejméně 3 další inhibitory jsou v preklinické nebo první fázi zkoušek. Účinek onkogenů *ras* blokuje také **salirasib**, farnesyl-derivát thiosalicilové kyseliny, ten však působí jiným mechanismem než zábranou prenylace – vypuzuje protein *ras* ze zakotvení v buněčné membráně, čímž je zabráněno předávání signálů k dělení buňky RAS dráhou.



Ovlivnění signalizační kaskády „ježek“

Lipoproteiny kódované geny **hedgehog** (*hh*, česky ježek, nazvané podle abnormálního vzhledu larvy mušky octomilky s mutovaným genem) jsou odpovědné za diferenciaci tkání v rostoucím embryu.

Působí u obratlovců i bezobratlých tak, že se váží na receptor spřažený s G-proteinem nazvaný Patched (Ptch, česky záplatovaný), který blokuje jiný transmembránový protein Smoothened (Smo, česky vyhlazený). Navázáním agonisty na Ptch je Smo odblokován, takže a může v buňce spustit **signalizační dráhu hedgehog**. Signály přenesené do buněčného jádra pak určují, které geny mají být transkribovány. Tím je řízen vývoj embrya. Signalizace *hh* má ale velký význam i pro dospělého organismus, kde řídí proliferaci kmenových buněk různých tkání. Přitom může jít o normální procesy v organismu, jako je aktivace vlasových kořínků, ale i o transformaci kmenových buněk na nádorové. Mutace vedoucí ke ztrátě funkčnosti Ptch nebo trvalé aktivaci Smo se mohou podílet na vývoji různých nádorů, zejména basaliomu, kožního nádoru vycházejícího z bazálních buněk pokožky. Vzhledem k významu signalizační kaskády *hh* i pro nádorové bujení, mohou být látky, které ji blokuje, protinádorovými léčivy.



Prvním léčivem této skupiny je **vismodegib** (Erivedge, Genentech), který byl povolen v r. 2012 v USA a v r. 2013 v EU k léčbě metastázujícího nebo relapsujícího basaliomu (typ kožního nádoru), který nelze chirurgicky odstranit a v r. 2015 pro léčbu meduloblastomu, nádoru mozku postihujícího děti. Zkoušen je ještě při celé řadě dalších onkologických indikací, jako jsou metastázující nádory střev a konečníku, pokročilé nádory žaludku a další, slibné jsou výsledky u nádorů pankreatu. V r. 2015 byl povolen pro léčbu basaliomu další lék, **sonidegib** (Odomzo, Novartis). I ten je dále zkoušen, mj. rovněž u nádorů mozku. V r. 2016 bylo zahájeno klinické zkoušení nového inhibitory signalizační dráhy *hh* **taladegibu** při léčbě nádorů prsu, naproti tomu byl po fázi II neúspěšného zkoušení při léčbě chondrosarkomu ukončen vývoj jiného inhibitory Smo, **saridegibu**, polosyntetického derivátu alkaloidu cyklopaminu s poměrně složitou strukturou.

Inhibitory telomerasy

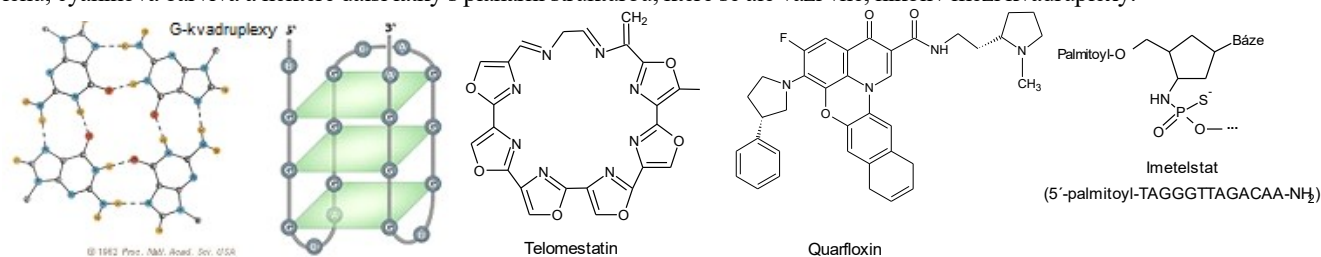
Normální buňky mají omezený potenciál růstu, po určitém počtu dělení zestárnou a odumírají. Naproti tomu nádorové buňky se mohou dělit trvale, lze je tedy považovat za nesmrtelné. Při regulaci délky života normálních diferencovaných buněk hraje důležitou roli postupné **zkracování telomerů** – specifických struktur na koncích chromosomů, k němuž dochází při dělení buněk.

Telomery obsahují opakující se hexanukleotidovou sekvenci TTAGGG tvořenou (u člověka) 8-14 tisíci párů nukleotidů s jednořetězcovým prodloužením, „G-převísem“, poskládaným do zvláštních struktur zvaných G-kvadruplexy tvořených čtyřmi molekulami guaninu propojených vodíkovými můstky. Koncovou strukturu telomeru si lze představit jako skelet několikpatrového domu, kde podlahy tvoří propojené molekuly guaninu. Ten spolu s 6 bílkovinami vytváří ochranný komplex, shelterin, potřebný pro stabilitu genomu. Při buněčném dělení ztrácí chromosomy určitou část telomerů, v normálních buňkách to je 100 - 150 párů bází za rok. Zkrácení telomerů na kritickou hodnotu, tzv. Hayflickův limit, dává signál k zastavení dalšího buněčného dělení zestárlé buňky.

V buňkách embrya, ale i „nesmrtelných“ rakovinných buňkách je ztráta délky telomerů při buněčném dělení kompenzována opětovným připojením nukleotidů, které katalyzuje enzym **telomerasa**. Je to ribonukleoprotein obsahující RNA, která je templátem pro syntézu telomerických nukleotidových sekvencí.

V normálních tkáňových buňkách dospělého organismu není telomerasa aktivní, její aktivita však byla prokázána až u 86% nádorových buněk. Aktivita telomerasy kontrolovaná proteinovým komplexem shelterinem, je důležitá pro nádorovou transformaci, kdy buňky získávají schopnost neomezeného dělení. Aby telomerasa mohla zajistit prodloužení telomerů, musí být jejich koncová DNA lineární a neposkládaná. Podmínkou jejího účinku je proto rozvolnění kvadruplexů.

Shelterin G-kvadruplexy stabilizuje. Tím vyřazuje telomerasu z činnosti a omezuje počet dělení buňky. Blokování telomerasové aktivity, ať již přímou interakcí s enzymem nebo stabilizací kvadruplexů, bylo považováno za jednu z perspektivních možností protinádorové terapie. Nebylo ale jednoznačně prokázáno, že tak lze skutečně zastavit růst a dělení nádorových buněk. Stabilizátory kvadrupletů by se kromě toho potenciálně mohly uplatnit i při řízení exprese některých genů a možná i při léčbě některých dědičných nemocí způsobených chromozomálními aberacemi. Americký nositel Nobelovy ceny s českými předky T.T. Cech zjistil, že některé kovové ionty mohou kvadruplexy stabilizovat, jiný tým zjistil, že kvadruplexy stabilizuje i 2,6-diaminoantrachinon. Hledány proto byly další sloučeniny s podobným účinkem. Přitom bylo zjištěno, že kromě aminoantrachinonů mohou mít stabilizační účinek i některé porfyriny, deriváty perylenu, cyaninová barviva a některé další látky s planární strukturou, které se ale váží vně, nikoliv mezi kvadruplexy.



Zajímavými stabilizátory jsou **telomestatin** produkovaný jedním kmenem streptomycet a jeho syntetická analoga, u nichž je více oxazolových kruhů nahrazeno thiazolovými (produkt je stálejší), neukázaly se ale jako vhodné pro další vývoj. Na zjištění, že telomerasu inhibují v důsledku interakce s G-kvadruplexy fluorované chinolony, navázal vývoj protinádorového léčiva **quarfloxinu** (také itarnafloxin, kódové označení CX-3543, Cyclene Pharmaceuticals) zkoušeného ve fázi II u neuroendokrinních karcinomů. Quarfloxin sice ovlivňuje stabilitu G-kvadruplexů a jejich komplexů s bílkoviny, ale jeho protinádorový účinek je připisován spíše blokování biosyntézy ribosomů než inhibici telomerasy. Inhibitorem telomerasy má být **6-thio-2'-deoxyguanosin** zkoušený při léčbě melanomu.

Rozvolnění koncových struktur telomerů katalyzuje enzym nazvaný tankyrasa 1 patřící do rodiny poly(ADP-ribose)polymeras (PARP – viz dále). Tankyrasa 1 interaguje s TRF1, jednou ze složek shelterinu. Její inhibice zastavuje buněčný cyklus, inhibitory tankyrasy by proto mohly být další skupinou protinádorových léčiv.

Odlíšným mechanismem inhibuje telomerasu **AS1411** (Antisoma), na guanin bohatý oligonukleotid s 26 bázemi, který sám vytváří kvadruplexy. Byl náhodně objeven při studiu oligonukleotidů vytvářejících strukturu trojitě spirály. Výsledky prvních klinických zkoušek AS1411 na malém souboru pacientů s nádory ledvin (fáze I) byly ale rozporné: AS1411 nevykazoval žádnou přílišnou toxicitu, u jednoho pacienta došlo ke kompletní a u druhého k téměř úplné remisi, u 5 pacientů se stav nezměnil, u 2 zhoršil. Nadějnější výsledky přinášely první zkoušky **imetelstatu** (v r. 2010 byla zahájena fáze II klinického zkoušení při léčbě myelofibrózy, nádorového onemocnění kostní dřeně), oligonukleotidu s 13 bázemi, modifikovanou cukernou složkou (3'-amino-3'-deoxyribose) propojené thiofosfátovými skupinami a 3-palmitoylamido-2-hydroxypropylester koncového thiofátu. Díky přítomnosti vyšší mastné kyseliny může imetelstat překonávat hematoencefalickou bariéru a být tak využit i k léčbě zhoubných nádorů mozku. Imetelstat narušoval funkce jater a v r. 2014 byly na žádost FDA jeho klinické zkoušky přerušeny, ještě v témže roce ale byly obnoveny.

Induktory apoptózy a látky narušující reparační mechanismy buňky

Pro správnou funkci organismu je důležitý jak růst a dělení buněk, tak i jejich zánik. K tomu dochází nejen při poškození buňky vnějšími fyzikálními i chemickými faktory, ale i při likvidaci nepotřebných buněk nebo buněk, u nichž došlo k určitým změnám nezaručujícím správnou funkci. V prvním případě jde o **nekrózu**, ve druhém o **apoptózu** (z řečtiny, *apo-* = od a *ptein* = padat), programovanou buněčnou smrt. Oba procesy se liší mj. v tom, že při nekróze zůstává buněčné jádro s DNA určitou dobu intaktní, zatímco proces apoptických změn na úrovni DNA začíná. Mechanismy apoptózy jsou poměrně složité a podílí se na nich celá řada enzymových reakcí. Signály k apoptóze dostává buňka buď ze svého vnitřního prostředí, mohou však přicházet i zvenčí. Signály k apoptóze vyvolané různými podněty se mohou v buňce spojit do jedné signální dráhy.

Jedním ze signálů k apoptóze je zkrácení telomerů na kritickou délku. Jiným je poškození DNA. Přitom je aktivován protein p53 kódovaný tumorsupresorovým genem *p53*. Protein p53 tak vlastně chrání buňku před nežádoucími dědičnými změnami genomu. Vyvolávat apoptózu může i aktivace dalších produktů tumorsupresorových genů nebo různé signální molekuly z vnějšího prostředí. Přitom hrají důležitou úlohu tzv. **receptory smrti** na povrchu buněk. Při interakcích cytokinů nebo jiných ligandů s těmito receptory dochází v cytoplasmě ke vzniku enzymového komplexu DISC indukujícího apoptózu. Cytoplasmatická část aktivovaného receptoru přitom aktivuje caspasu 8 (v české literatuře se někdy píše o kaspasách, jde však o zkratku výrazu cysteinyl-**asp**artát specifická proteasa, takže správně by se název měl psát a vyslovovat s **e**), která pak aktivuje další enzymy apoptické dráhy. Existují i jiné mechanismy buněčné smrti nezávislé na aktivaci caspas. Apoptické procesy lze zpočátku zastavit, po určité fázi se však stávají nevratnými. Produkty onkogenů mohou kroky vedoucí k apoptóze zablokovat.

Některé induktory apoptózy jsou zkoušeny jako protinádorová léčiva. Přírodním induktorem je např. faktor „nekrózy“ nádorů, TNF, studovány jsou však i některé další bílkovinné molekuly.

Faktor nekrózy nádorů indukuje apoptózu jako přirozený agonista „receptoru smrti“. Jinými agonisty jsou s TNF příbuzný TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) i další cytokiny.

Umělým agonistou receptorů je monoklonální protilátka **mapatumumab** (TRAIL-R1 Mab, Cambridge Antibody), která postoupila do fáze II klinických zkoušek při léčbě nádorů konečnicku a střev, lymfomů a některých dalších nádorů. Zahájeny byly klinické zkoušky rekombinantního **TRAIL AMG-951** (Amgen). Indukce apoptózy funkčními tumorsupresorovými geny nebo ligandy receptorů smrti je také cílem některých zkoušených přípravků pro genovou terapii (viz Farm12). Dalším induktorem apoptózy je mitochondriální protein SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase), který je uvolňován při působení proapoptických stimulů do buňky. SMAC je antagonistou některých inhibitorů apoptických proteinů IAP a vyvolává jejich degradaci v proteasomech. V protinádorové terapii se ale sám nepoužívá, vyvinuta však byla některá nízkomolekulární „SMAC-mimetika“, např. **birinapant** (TL32711), **LCL161**, **GDC-0917**, **SM-164** nebo **HGS1029** s podobným antagonistickým účinkem na inhibitory apoptických proteinů, která začínají být klinicky zkoušena.

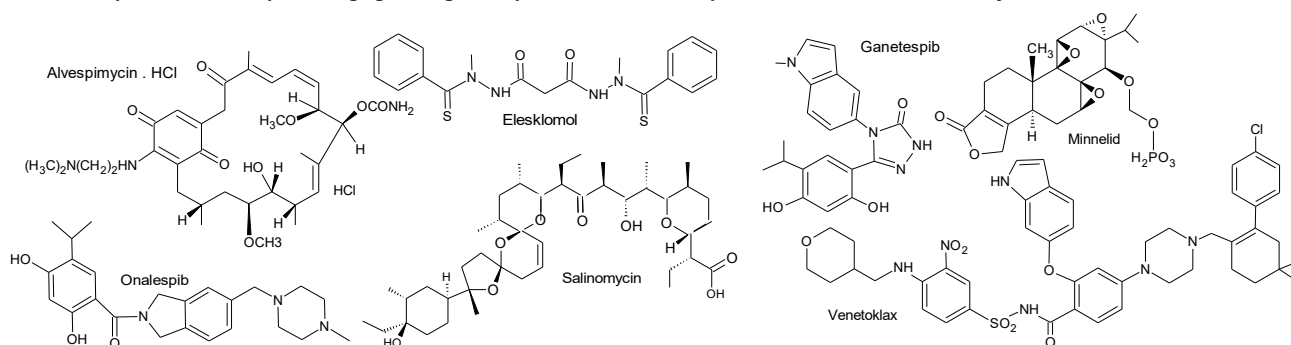
Kromě SMAC-mimetik mohou apoptotické procesy nastartovat i různá další nízkomolekulární léčiva, jejichž klinické zkoušení pokročilo dále.

Indukce apoptózy je patrně hlavní příčinou protinádorového účinku oxidu arsenitého, u některých cytostatik (např. paklitaxelu), u antagonistů pohlavních hormonů a kortikoidů je užitečným doprovodným účinkem. Z různých nízkomolekulárních léčiv určených pro jiné oblasti terapie mohou apoptózu indukovat např. i sildenafil (Viagra) nebo kanabinoidy z marihuany.

Za induktory apoptózy lze považovat i benzochinonové antibiotikum **geldenamycin** a jeho deriváty s lepšími farmakologickými vlastnostmi **tanespimycin** a zejména **alvespimycin** (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldenamycin) který je ve fázi II klinického zkoušení. Tyto látky indukují degradaci některých proteinů kódovaných mutovanými geny, mimo jiné i mutovaného proteinu p53 (gen *p53* je tumorsupresorový gen, bílkovinné transkripty jeho mutované formy mají pozměněnou konformaci a působí onkogenně). Účinek je zprostředkovan vazbou benzochinonových derivátů na protein tepelného šoku Hsp90, který sice sám nemá kinasovou aktivitu, ale mimo jiné stabilizuje receptory pro růstové faktory a různé kinasy účastníci se přenosu signálů k buněčnému růstu a dělení, jako jsou kinasy PI3K a AKT. Inhibice Hsp90 poškozuje i mitochondrie nádorových buněk.

Inhibitory Hsp90 jsou i **ganetespib** zkoušený při léčbě nemalobuněčných nádorů plic a mesotheliomu, nádoru vyvolaného vdechováním vláken asbestu, **luminespib** (AUY922), který by podle preklinických zkoušek mohl být využit k léčbě nádorů pankreatu a **onalespib**, který je v kombinaci s olaparibem (viz dále) zkoušen při léčbě řady nádorů. Podle preklinických studií na zvířecích modelech je onalespib schopen překlenout hematoencefalickou bariéru a mohl by tak být v kombinaci s temozolomidem využit k léčbě glioblastomů, nádorů mozku. Jiný induktor apoptózy, **elsklomol**, vyvolává buněčnou smrt prostřednictvím jiného proteinu tepelného šoku Hsp70 a oxidativního stresu. Jeho první klinické zkoušky skončily neúspěchem, pozdější výsledky ale naznačují, že by se mohl uplatnit při léčbě metastazujícího melanomu. V září 2013 byly zahájeny klinické zkoušky dalšího inhibitoru Hsp70, **minnelidu**, ve vodě rozpustného derivátu triptolidu, látky izolované z čínské rostliny *Tripterygium wilfordii*. Apoptózu indukují i antibakteriálně a kokcidiostaticky účinný produkt bakterie *Streptomyces album* **salinomycin**. Salinomycin blokuje signální Wnt dráhu, inhibuje opravy DNA. Pilotní studie ukázaly, že může likvidovat i kmenové nádorové buňky, což zvýšilo zájem o jeho využití jako protinádorového léčiva.

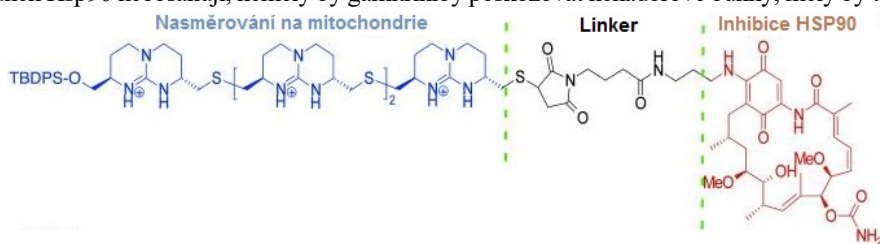
Venetoklax (Venclexta/Venclyxto, AbbVie, Roche) byl v r. 2016 povolen FDA i EMA pro léčbu chronické lymfocytické leukemie u pacientů s delecí na chromosomu 17, kteří nereagovali na předchozí jinou léčbu, zkoušen je spolu s kobinetinibem nebo idasanutlinem při léčbě dalších hematologických malignit. Venetoklax inhibuje protein Bcl-2 (**B** cell lymphoma – 2), který má klíčovou roli pro přežívání buněk a je spojován se vznikem rezistence u některých leukemií a lymfomů. Zablokování Bcl-2 má v nádorových buňkách vyvolat apoptické procesy. Bcl-2 v nádorových buňkách ale často mutuje, což vede ke vzniku rezistence.



Bílkovin, které mají podobnou strukturu s Bcl-2, je několik. Regulují propustnost mitochondriální membrány, která má význam pro průběh apoptózy. Některé, jako protein BAX, který lze považovat za ústřední mediátor apoptózy, i některé příbuzné bílkoviny, jsou proapoptické, protože zvyšují propustnost membrány a tím umožňují sekreci cytochromu c z mitochondrií. Ten pak dává buňkám signál k pokračování caspasové kaskády apoptických procesů. Některé bílkoviny této rodiny, mezi něž patří i samotný protein Bcl2, jsou ale protiapoptické, protože proapoptické proteiny deaktivují. Jejich nadměrná exprese přispívá k rezistenci nádorových buněk vůči protinádorovým přípravkům a tím i k jejich růstu a množení. Aktivace proteinu Bax některými léčivy, jako je pyrazolonový derivát s kódovým označením **B TSA1**, tak může významně přispět k účinnosti protinádorové terapie.

Cílenými léčivy by se mohly stát i **gamitribinib**. Ty také inhibují protein tepelného šoku 90 (Hsp90) a poškozuje mitochondrie nádorových buněk. Zajímavé jsou tím, že je tvoří dvě různě vzájemně propojené interagující části. Kromě části molekuly inhibující Hsp90, která je stejná, obsahují gamitribinib část interagující s mitochondriemi. Ta se u zkoušených gamitribinibů liší. Bez ohledu na rozdíly v její struktuře dochází při interakci gamitribinibů ke ztrátě potenciálu membrány mitochondrií nádorových buněk, což vede ke změně její permeability a k buněčným procesům, které v konečném důsledku vyvolávají apoptózu.

Pokud by molekula interagující s mitochondriemi nebyla propojena s inhibítozem Hsp90, pak by se tento efekt neprojevil. Jelikož mitochondrie normálních buněk Hsp90 neobsahují, neměly by gamitribiny poškozovat nenádorové buňky, měly by tak být vysoce selektivní.



Gamitribin G4 (podle B.H.Kang *et al.*, Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J Clin Invest.* **2009**; 119(3): 454–464.

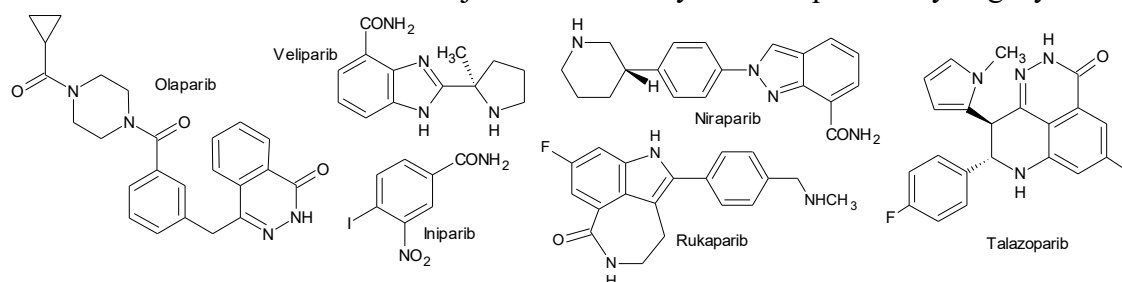
Specifickým mechanismem buněčné smrti je ferroptóza popsaná poprvé v r. 2012 a studovaná v poslední době. Vyvolávají ji ionty železa a reaktivní kyslíkaté radikály a je charakterizovaná ztrátou selektivní propustnosti a narušením integrity mitochondriálních membrán v důsledku nadměrné peroxidace membránových lipidů. Vyvolávat ji mohou některé nízkomolekulární látky, jako je erastin nebo i některá cytostatika altretamin, sorafenib a další, brání jí látky chelatující ionty železa, glutathion a thiolové látky.

Zásahy do mechanismu opravy DNA

DNA, ať již v buněčném jádře nebo v mitochondriích, je v buňkách neustále poškozována různými vnějšími i vnitrobuněčnými faktory. Kromě mutací dochází přitom i k poškození DNA, které se projevuje narušením její prostorové struktury a integrity řetězců, jako jsou zlomy v jednom nebo dvou polynukleotidových řetězcích, vznik různých aduktů, propojení bází apod. Aby byla zajištěna genetická stabilita, disponují buňky mechanismy, které rozpoznávají poškozením DNA vzniklé abnormality a opravují je podle polynukleotidových sekvencí v komplementárním řetězci DNA nebo homologním chromosomu.

Dokud není poškození opraveno, je zastavena transkripce i replikace DNA a tedy i buněčné dělení. Nelze-li poškození opravit, je vyvolána apoptóza. Inhibitory enzymů opravujících DNA proto mohou zastavovat nádorové bujení.

Dojde-li k poškození jednoho řetězce, opravuje DNA **poly(adenosindifosforiboso)polymerasa (PARP)**. Je-li PARP inhibována kumulují se jednořetězové zlomy DNA, což pak při replikaci vede ke vzniku zlomů dvouřetězových. Ty normálně pomáhají opravit produkty exprese tumorsupresorových genů *BRCA1* a *BRCA2*. Jsou-li však tyto tumorsupresorové geny poškozeny mutací – což je případ řady nádorů, zejména nádorů prsu, vaječníků a některých dalších – dochází při inhibici PARP k neopravitelnému poškození DNA, které vyvolá procesy buněčné smrti. V posledních letech jsou proto inhibitory PARP intenzivně studovány a řada z nich byla úspěšně dovedena do protinádorové terapie. Inhibitory PARP vyvolávají „**syntetickou letalitu**“ – selektivně usmrcují nádorové buňky s mutací poškozenými geny *BRCA*.



Iniparib s jednoduchou chemickou strukturou (4-jod-3-nitrobenzamid) po prvních slibných výsledcích selhal ve fázi III, když neprodlužoval dobu přežití pacientek, ani dobu do progresu metastázujících nádorů prsu. Později ale byl úspěšně zkoušen v kombinaci s radioterapií a temozolomidem při léčbě nádorů mozku. Přitom ale nepůsobil jako inhibitor PARP, ale jako zdroj reaktivních dusíkatých radikálů. Jednoduchou strukturu má i **veliparib**, který byl neúspěšně zkoušen u metastázujících nádorů plic a nádorů prsu, úspěšný ale byl v kombinaci s karboplatinou a paklitaxelem u nádorů vaječníků, vejcovodů a pobřišnice. Nejúspěšnějším PARP inhibítozem je **olaparib** (Lynparza, AstraZeneca), který byl v závěru roku 2014 povolen pro léčbu pokročilých nádorů vaječníků rezistentních vůči platinovým cytostatikům, používá se i pro léčbu metastázujících nádorů prsu a prostaty. V kombinaci s inhibitory imunopresivních proteinů rodiny BET (zkratka pro Bromodomain and Extra-Terminal domain, název „bromodoména se nevztahuje k bromu, ale k názvu jednoho genu *Drosophily*; proteiny BET se účastní transacetylace histonů a remodelace chromatinu), např. derivátu thienotriazolodiazepinu JQ1, je účinný i u nádorů bez mutací genů *BRCA*. Osvědčuje se i u nádorů pankreatu. Slibné výsledky přineslo zkoušení **talazoparibu** (Talzenna, Medivation, povolen v r. 2018)), který by měl být při léčbě nádorů prsu účinnější než olaparib. Pro léčbu opakujících se nádorů vaječníků byl v r. 2016 a později i pro léčbu nádorů prostaty povolen **rukaparib** (Rubraca, Clovis Oncology). **Niraparib** (Zejula, Tesaro) byl povolen v r. 2017 také pro léčbu opakujících se nádorů vaječníků, a to i bez nálezu mutací genů *BRCA*, pak i nádorů vejcovodů, pobřišnice a metastázujících nádorů prostaty.

Oprav poškozené DNA se neúčastní pouze PARP ale i několik dalších enzymů včetně topoisomeras zmíněných v předchozí přednášce nebo i výše zmíněná cdk12. Inhibice reparačních enzymů patří mezi mechanismy zastavující růst a dělení nádorových buněk. Na opravách dvouřetězcových zlomů DNA homologní rekombinací se podílejí enzymy z rodiny helikas, jejichž základní funkcí je rozplést dvoušroubovici DNA před replikací. Spojování rozpojených sekvencí DNA zajišťují DNA ligasy. Důležitou roli při koordinaci buněčné reakce na poškození DNA, tj. při zastavení dělení, opravě poškození nebo apoptóze, mají kinasy CHEK1 (Chk1, Checkpoint kinase 1) a CHEK2, serin-threoninové kinasy kontrolního bodu buněčného cyklu. Vývoji nových inhibitorů reparačních enzymů se věnují i pracovníci MU a CEITECu.

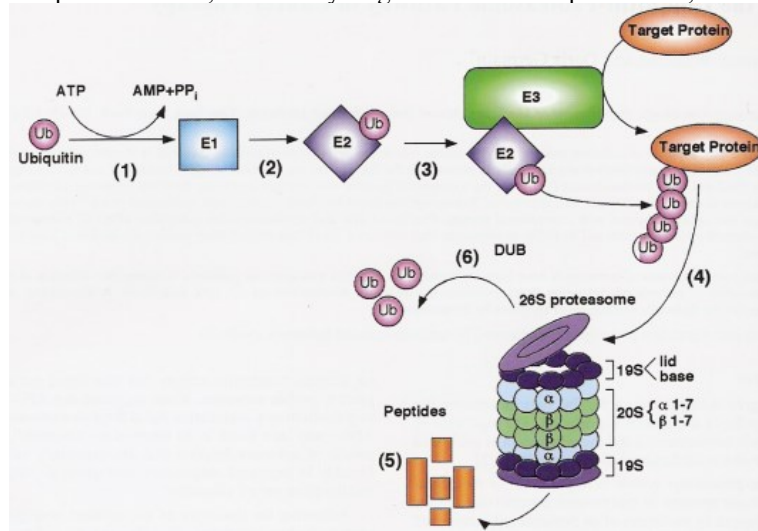
Inhibitory proteasomu

Jako další typy léků se do protinádorové terapie prosazují také **inhibitory proteasomu**, buněčné struktury, která má důležitou úlohu při recyklaci bílkovin v buňce.

Většina bílkovin je v buňkách pravidelně obměňována za nové, a to i v buňkách, které se už nedělí, jako jsou nervové buňky. Průměrná životnost buněčných bílkovin je několik dní, některé však mají biologický poločas jen několik desítek minut, jiné naopak několik týdnů. Kromě bílkovin, které splnily svůj úkol a jsou pro buňku již zbytečné nebo i nežádoucí, se musí organismus zbavovat poškozených nebo cizorodých bílkovin. To v buňkách vykonávají **proteasomy**, buněčné struktury obsahující několik proteolytických enzymů, které postupně rozloží bílkoviny na peptidy, které pak štěpí aminopeptidasa na aminokyseliny. Ty pak buňka využije ke stavbě nových bílkovin. V každé buňce vyšších organismů je až 30.000 proteasomů, které se účastní recyklace bílkovin. Velký význam mají proteasomy pro likvidaci proteinkinás, které již splnily svoji úlohu v buněčné signalizaci a řízení procesů dělení buněk. Proteasomy přitom fungují jako jakési biologické hodiny, které určují časový průběh koncentrace důležitých enzymů. Tím vlastně řídí jednotlivé fáze buněčného cyklu.

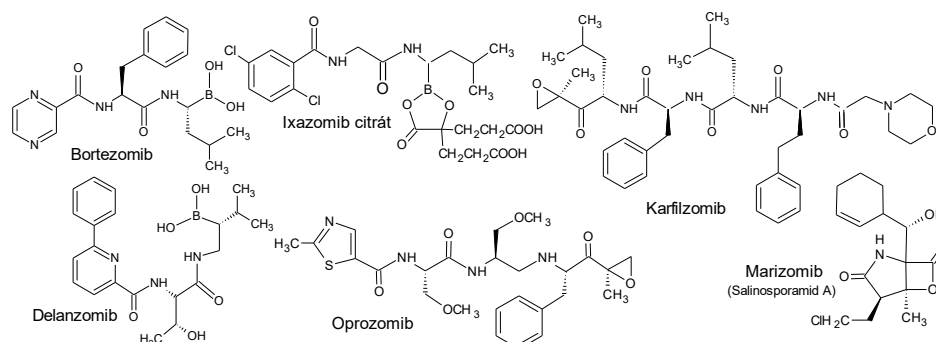
Aby proteasomy poznaly, co mají rozštěpit, musí být nepotřebná nebo poškozená bílkovina označena. K označení slouží navázání několika molekul polypeptidu **ubikvitinu**, který obsahuje 76 aminokyselin.

Ubikvitinace je pro bílkoviny „políbek smrti“. Je katalyzována třemi enzymy, které vlastně zprostředkovávají řízení chodu buňky a jak se později ukázalo, mohou se podílet na nádorové transformaci. Při označování bílkovin určených k degradaci proteasomem je nejprve na molekulu ubikvitinu z ATP navázán adenosinmonofosfát. Reakce je katalyzována ubikvitin aktivujícím enzymem, který je označován symbolem E1. Adenylovaný ubikvitin je pak ubikvitin konjugujícím enzymem (E2) navázán na další molekulu adenylovaného ubikvitinu, což se může několikrát opakovat. Nakonec je několik spojených molekul ubikvitinu (nejméně 4) navázáno na cílovou bílkovinu jedním z enzymů rozsáhlé rodiny substrátově specifických ubikvitin ligas (E3), který umí rozpoznat bílkovinu určenou k likvidaci. Označená bílkovina je pak transportována ubikvitin receptorovým proteinem k proteasomu, jehož „víko“ rozpozná receptor a vpustí bílkovinu, která má být degradována dovnitř proteasomu, kde dojde k proteolýze.



Některé látky mohou ubikvitinaci nebo konečnou činnost proteasomu selektivně inhibovat, aniž by interagovaly s ostatními buněčnými strukturami. Inhibice zastavuje recyklaci bílkovin a tím i buněčné dělení a vnáší do buňky chaos, který může vést k buněčné smrti, apoptóze. Inhibitory proteasomu proto mají protinádorový účinek. Chemicky to jsou analoga oligopeptidů, která mají koncový karboxyl nahrazen zbytkem kyseliny borité nebo ketoepoxidickým seskupením.

Jako první inhibitor proteasomu se do protinádorové terapie dostal **bortezomib** (Velcade, Millenium a Janssen-Cilag), který byl schválen jako lék pro léčbu mnohočetného myelomu. V brzké době by však jeho indikace mohly být rozšířeny na další nádorová i jiná onemocnění. Bortezomib je aplikován injekčně, **ixazomib citrát** (Ninlaro, Takeda) povolený v listopadu 2015 rovněž pro léčbu mnohočetného myelomu (v kombinaci s lenalidomidem a dexamethazonem) může být podáván orálně. Jde o profarmakum, které přechází na účinný ixazomib. Pro stejnou indikaci je určen další orální boronátový analog **delanzomib** (CEP-18770, Teva), který je ve stadiu klinických zkoušek.



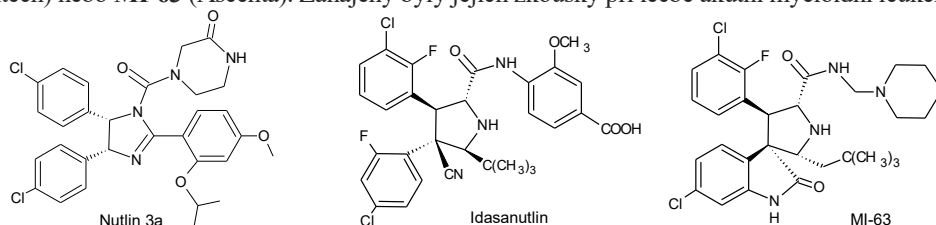
Karfilzomib (Kyprolis, PR-171, Amgen) podávaný v infuzi byl povolen v r. 2015, a to opět pro kombinovanou terapii mnohočetného myelomu. Je to inhibitor proteasomu 2. generace, který v molekule nemá boronátovou skupinu, ale oxiranový kruh v sousedství ketoskupiny. Jeho nevýhodou je zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod. Zkoušen je další ketoepoxidický inhibitor proteasomu **oprozomib** (ONX 0912, dříve PR-047), jehož předností by měla být možnost orálního podání. Odlišnou strukturu má přirozený inhibitor proteasomu **marizomib (salinosporamid A)** se čtyřčlenným β -laktonovým kruhem a chlorem v postranním řetězci, který je produkován bakteriemi *Salinispora tropica* získanými z mořských usazenin. Marizomib je klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu, působí ale i na jiné nádory.

Při recyklaci bílkovin je třeba, aby peptidy produkované proteasomem byly dále rozštěpeny aminopeptidasou na aminokyseliny.

Jestliže se tomu zabrání inhibicí aminopeptidasy, nedostávají se buňce stavební kameny pro biosyntézu nových bílkovin, buňka nemůže růst a dělit se. Inhibitory aminopeptidasy proto jsou potenciálními protinádorovými léčivy stejně jako inhibitory proteasomu. Z nich byl zkoušen jako **tosedostat**, po smrti jednoho pacienta ale byly zkoušky v r. 2013 zastaveny. Tosedostat, hydroxamová kyselina charakteru dipeptidu esterifikovaného cyklopentanolem, je profarmakem, jehož esterová skupina enzymům krevní plasmy odolává, ale po proniknutí do buněk je hydrolyzována karboxyesterasami.

Jednou ze specifických ubikvitinligas je protein MDM2, jehož substrátem je tumorsupresor p53. Tím, že jej označuje ubikvitinylací, dává MDM2 signál k jeho degradaci v proteasomu. Tumorsupresor pak nemůže plnit svoji roli. V nádorových buňkách bývá koncentrace MDM2 zvýšena. Zabránění interakce mezi MDM2 a p53 stabilizuje tumorsupresor p53, který pak může indukovat apoptózu nádorových buněk.

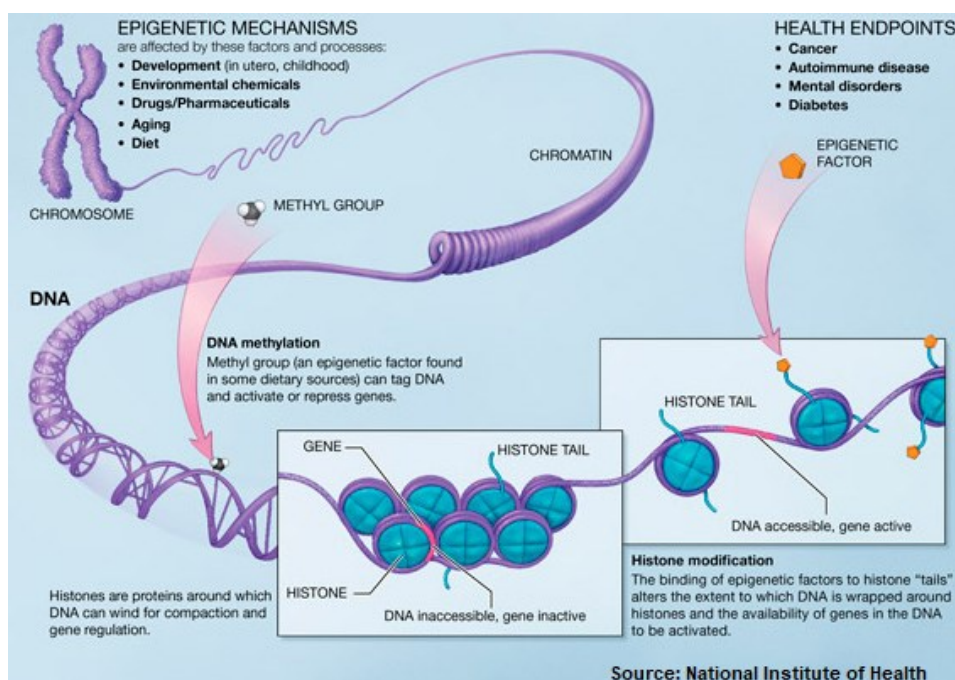
Látkami, které mohou interakci MDM2 s p53 zablokovat, jsou **nutliny**, deriváty *cis*-imidazolinu nebo podobné deriváty pyrrolidinu **idasanutlin** (Genentech) nebo **MI-63** (Ascenta). Zahájeny byly jejich zkoušky při léčbě akutní myeloidní leukemie.



Možnosti ovlivnění epigenetických změn podílejících se na regulaci exprese genů

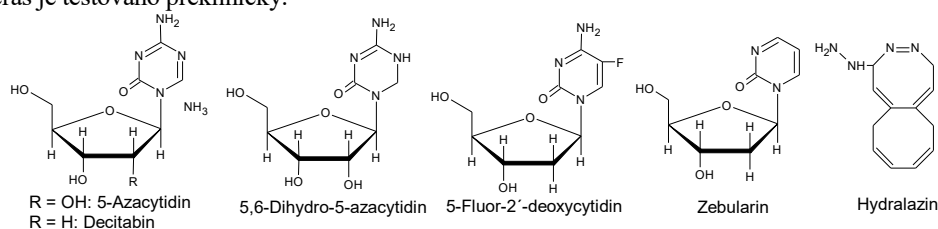
Expresi genů ovlivňují **epigenetické změny**. Při nich se DNA nemění, ale mění se její přístupnost pro enzymy podílející se na transkripci. Nemohou-li se transkripční faktory k DNA dostat, k přepisu dojít nemůže, gen je „umlčen“. Epigenetické změny mohou probíhat v samotné DNA nebo v histonech, bázičských bílkovinách, které DNA v jádře buňky doprovázejí. Změny jsou reverzibilní, což umožňuje opravy pozměněných DNA nebo bílkovin a obnovení jejich původní struktury a funkce. Na úrovni DNA ovlivňuje transkripci methylace cytosinu. Je-li methylován větší počet cytosinových zbytků v DNA, je přepis genu znesnadněn. Ten je znesnadněn i v případě, že DNA je vázána na histony příliš pevně.

V buněčném jádře se vytváří složka chromosomů chromatin, komplex DNA a histonů, kolem nichž jsou úseky vláknů DNA ovinuty. Přitom ovijí vždy dva závitky dvoušroubicové DNA komplex tvořený dvojicemi 4 histonů. Přitom vznikají nukleosomy, strukturální podjednotky chromatinových vláken, které jsou propojeny komplexem DNA s jedním histonem. Histony jsou bázičké, protože v jejich molekulách je mnoho lysinových zbytků s volnými koncovými aminoskupinami. Tyto aminoskupiny mohou být postranslačně modifikovány acetylací, methylací, fosforylací, ubikvitinací apod. Aby transkripce DNA na mRNA mohla v nukleosomích proběhnout musí být kyselá DNA vázána na bázičké histony volně. K tomu je třeba, aby byla vysoká bazicita histonů snížena potranslační acetylací nebo fosforylací. Nejsou-li histony acetylovány nebo jsou-li jejich aminoskupiny naopak methylovány, je DNA na histony přichycena pevněji a možnosti transkripce jsou tím zhoršeny nebo i znemožněny.



V nádorových buňkách je vyšší zastoupení 5-methylcytosinu v DNA než v normální tkáni a naopak stupeň acetylace histonů v chromatinu nádorových buněk je nižší. DNA je methylována DNA-methyltransferasami. Inhibice DNA-methyltransferas může methylaci DNA zvrátit, inhibitory proto mohou být využity k léčbě onemocnění způsobených umlčením tumorsupresorových a některých dalších genů.

K methylaci DNA dochází téměř výlučně v sekvencích CpG, které se často vyskytují v promotorových oblastech. Methylovaná sekvence vytváří vazebnou doménu pro některé chromosomální proteiny (MBD, methylated CpG binding domain). Tím je potlačována transkripce. Methylová skupina se přitom váže do polohy 5 cytosinového zbytku, vznikající 5-methylcytosin je deaminován snáze než nemethylovaná báze. To má za následek mutaci, protože produktem deaminace je thymin. Nadměrná methylace DNA tak vnáší do genomu i chaos a nestabilitu. Účinnými inhibitory DNA-methyltransferas jsou **5-azacytidin** a jeho 2'-deoxyderivát, **decitabin**, které byly poprvé připraveny na ÚOChB AV ČR jako antimetabolit cytosinových složek nukleových kyselin. V protinádorové terapii se ale začaly významněji uplatňovat teprve, až došlo k pochopení významu epigenetických změn. Obě látky se používají k léčbě myelodysplastického syndromu, hematologického onemocnění, které často předchází leukemii, v dalších indikacích jsou zkoušeny v kombinaci s jinými protinádorovými léky. Klinicky jsou zkoušeny i **guadecitabin**, **5,6-dihydro-5-azacytidin**, **5-fluor-2'-deoxycytidin**, **zebularin** a strukturně odlišný **hydralazin**. Několik dalších nenukleosidických inhibitorů DNA-methyltransferas je testováno preklinicky.

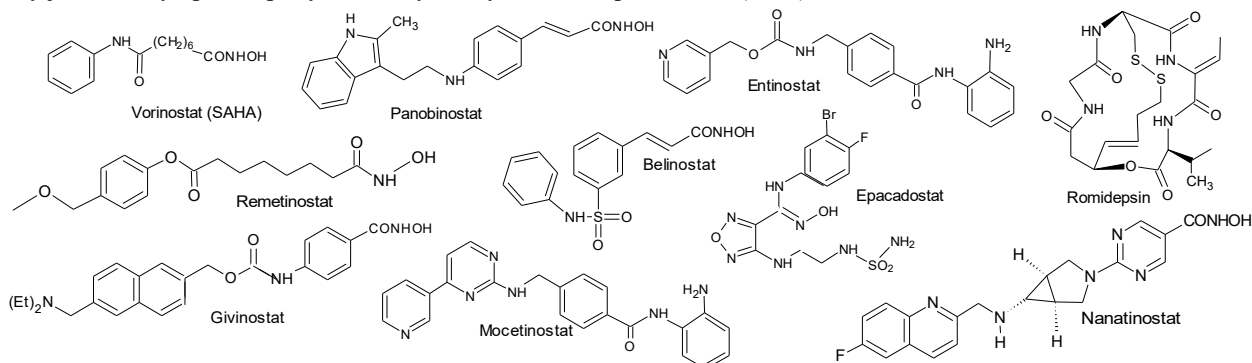


Modifikacemi volných aminoskupin lysinu jsou ovlivňovány interakce histonů s DNA, ale i s faktory regulujícími replikaci a transkripci DNA a patrně i s enzymy podílejícími se na opravách a metabolismu DNA. Modifikace histonů ovlivňují také jejich stabilitu, protože na acylované aminoskupiny se nemůže navázat ubiquitin a tím je zablokována degradace histonů v proteasomech. Acetylací histonů nebo naopak odštěpením acetyl skupiny, případně i methylací aminoskupiny lysinových zbytků se mění bazicitata histonů a tím může být ovlivněna řada buněčných procesů.

Odštěpení acetyl skupiny katalyzuje enzym histondeacetylasa (HDAC). HDAC je metaloprotein, který pro svoji aktivitu potřebuje zinek. Je tedy inhibována chelátotvornými látkami, které mohou zinek vázat. Při některých nádorových onemocněních, zejména hematologických malignitách, je aktivita HDAC v nádorových buňkách zvýšena. Inhibitory HDAC mohou růst nádorů brzdít a být tak využity v protinádorové terapii. Používají se především v kombinacích s jinými protinádorovými léčivy, jejichž účinek potencují.

Jako první léčivo ze skupiny inhibitorů HDAC byl v říjnu 2006 povolen **vorinostat** (suberoylanilidhydroxamová kyselina, SAHA – Zolinza, Merck), a to pro terapii jednoho typu lymfomu, v r. 2015 byl povolen **panobinostat** (Farydak, Novartis) pro léčbu mnohočetného myelomu. Při léčbě nádorů mozku působí synergicky s radioterapií.

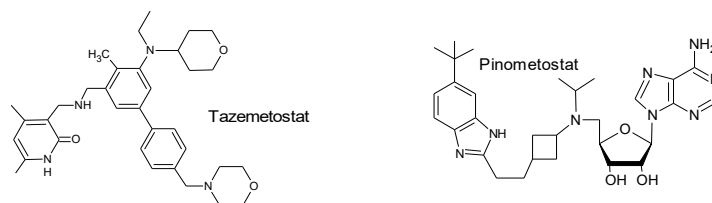
Dalšími inhibitory HDAC jsou deriváty hydroxamové kyseliny **belinostat** (Beleodaq, Spectrum Pharmaceuticals) povolený pro léčbu lymfomu vycházejícího z T-buněk, klinicky zkoušený **remetinostat** určený k léčbě kožních T-lymfomů, **givinostat** (Italfarmaco) povolený v letech 2010 a 2013 jako lék „sírotek“ pro některé vzácnější neonkologické indikace a zkoušený při léčbě relapsů leukemii a lymfomů a **epakadostat** (nádory plic), 2-aminoanilidy substituovaných benzoových kyselin **mocetinostat** a **entinostat** a některé jiné chelatající látky. Entinostat zvyšuje účinnost retinoidů, zkoušen byl mimo jiné i v kombinaci s 5-azacytidinem. Při léčbě nádorů plic měla tato kombinace dvou typů epigenetických léčiv přinést dokonce některá „dramatická zlepšení“ stavu pacientů. Inhibitorem HDAC druhé generace je **nanatinostat** (také traktinostat, dříve VRx-3996, Viracta), který byl v r. 2019 povolen jako lék pro vzácná onemocnění pro léčbu dvou typů lymfomů a postranplantační lymfoblastické poruchy. Klinicky je zkoušený i při terapii lymfomů vyvolaných virem Epstein-Barr (EBV).



Velmi účinným inhibitorem HDAC je depsipeptid **romidepsin** (Istodax, Fujisawa), produkt půdní bakterie *Chromobacterium violaceum*, který byl v listopadu 2009 povolen pro léčbu kožních lymfomů vycházejících z T-lymfocytů a je dále zkoušen v jiných onkologických indikacích. V kombinaci s decitabinem aktivuje tumorsupresorový gen, který je umlčen v nádorech ledvin a nádorech prsu, výhodná je i kombinace s protilátkami aktivujícími imunitní systém. V některých HDAC lze inhibovat i jinými mechanismy a zajímavé je, že účinnými inhibitory tohoto enzymu jsou i jednoduché mastné kyseliny – klinicky jsou zkoušeny **solí kyseliny máselné** a **valproové** (2-propylvalerová kyselina, valproát sodný se používá zejména k potlačování epileptických záchvatů).

Methylaci aminoskupin v histonech katalyzuje lysin-N-methyltransferasa EZH2, která je enzymovou podjednotkou polyhřebínkového represivního komplexu (PRC2, Polycomb Repressive Complex 2) umlčujícího geny. Nadměrná exprese genu pro EZH2 byla zjištěna u nádorů prsu, prostaty, melanomu a močového měchýře apod., mutace u onemocnění nervového systému.

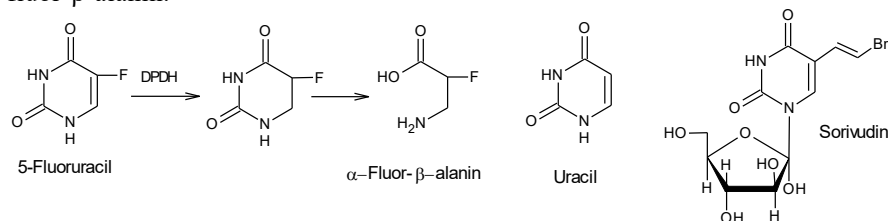
Inhibitorem EZH2 je **tazemetostat** (EPZ6438, Epizyme), jehož podání vyvolávalo při preklinických studiích buněčnou smrt a diferenciaci. Úspěšné byly i první klinické zkoušky tohoto orálního přípravku při léčbě ne Hodgkinských lymfomů, mesotheliomu a některých vzácnějších typů dětských nádorů. Jiným inhibitorem je aminonukleosidový derivát **pinometostat**, který je zkoušen při léčbě agresivní akutní **myeloidní leukemie**.



Překonávání rezistence nádorových buněk

Jedním z problémů chemoterapie je **rezistence nádorových buněk** vůči používaným cytostatikům. Příčinou vzniku rezistence je více, jednou z nich je rychlá metabolická inaktivace cytostatik.

Protinádorový antimetabolit 5-fluoruracil nepůsobí na všechny pacienty stejně. Příčinou jsou rozdíly v aktivitě dihydropyrimidindehydrogenasy (DPDH). Ta katalyzuje redukci 5-fluoruracilu na 4,5-dihydro-5-fluoruracil, který se nakonec rozloží na α -fluor- β -alanin.



Při zvýšení aktivity DPD ztrácí 5-fluoruracil svoji účinnost, pro pacienty s deficiencí degradačního enzymu může být 5-fluoruracil příliš toxický. Metabolickou inaktivaci 5-fluoruracilu potlačuje přirozený substrát DPD uracil, jiným účinným inhibítorem DPD je např. anitivirotikum **sovivudin**, (E)-5-(2-bromvinyl)-1 β -D-arabinofuranosyluracil.

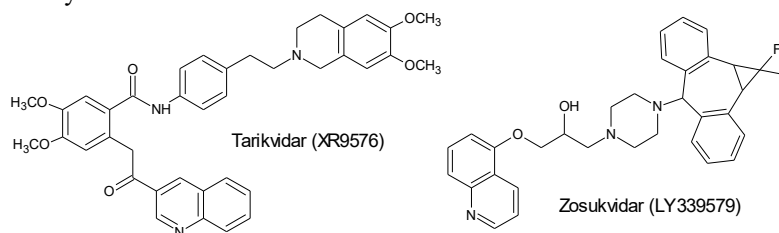
Jinou příčinou rezistence může být v případě léčiv působících na proteiny kódované mutovanými geny genetická nestabilita nádorových buněk. Mutovaný gen, jehož bílkovinný produkt – enzym – je léčivem inhibován, může při častém a relativně rychlém dělení nádorových buněk dále mutovat, což může ovlivnit interakce léčiva. V takovém případě je někdy třeba zvýšit dávku léčiva, to ale může vést k prohloubení vedlejších účinků, často ale bývá nutná náhrada původního léčiva novým inhibítorem.

Platí to zejména pro některé inhibitory proteinkinasy, jako je např. imatinib. Bodové mutace fúzního genu *Bcr-Abl* mohou mít za následek změnu interagujících skupin na místě vazby imatinibu. Takových mutací byla zjištěna celá řada, např. u chronické myeloidní leukemie způsobené fúzním genem *Bcr-Abl* jich bylo popsáno nejméně 19. Např. mutace T315I zjištěná u 4-15% pacientů s rezistentní leukemií, při níž v genu dojde k záměně cytosinu za thymin, má za následek, že v poloze 315 polypeptidického řetězce dojde k náhradě threoninu za isoleucin. Tím je ale z bílkoviny na místě interakce eliminován kyslík, který je potřebný pro vytvoření vodíkové vazby s imatinibem. K 50% inhibici enzymu je pak potřebná desetinásobně zvýšená koncentrace léčiva než před mutací, což ale v tomto případě znamená, že imatinib nelze dále k léčbě používat. Jiné mutace mohou změnit konformaci kritického místa kódované bílkoviny, takže interakce s léčivem je znesnadněná nebo dokonce vyloučená ze sterických důvodů. Nové mutace *Bcr-Abl* nemusí způsobovat rezistenci pouze na imatinib, ale mohou ovlivnit účinnost i dalších TKI.

Specifickou příčinou rezistence nádorových buněk na některá léčiva je nadměrná exprese **glykoproteinu P** (P-gp). P-gp transportuje léčiva ven z nádorové buňky i proti koncentračnímu gradientu. Nepůsobí specificky, ale transportuje z buňky cytostatika s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. Je tedy příčinou tzv. „mnohočetné“ rezistence (multidrug resistance, MDR) nádorových buněk na cytostatika.

Překonat rezistenci bakterií vůči penicilinovým a cefalosporinovým antibiotikům se do značné míry daří současným podáváním antibiotika a inhibitoru β -laktamasy, enzymu, který tato antibiotika inaktivuje štěpením jejich β -laktamového kruhu. Podobné pokusy o překonání rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům inhibicí P-gp ale v minulosti přinášely spíše zklamání.

Pak se ukázalo, že některá léčiva, např. cyklický oligopeptid **cyklosporin A** (používaný při transplantacích k překonání odmítnutí transplantovaného orgánu příjemcem) nebo **verapamil** (blokátor vápníkového kanálu používaný k léčení onemocnění srdce), mohou aktivně transport cytostatik ven z buňky brzdít. Jejich širšímu využití v protinádorové léčbě sice bránily jejich vlastní účinky. Poznání, poznání, že je možné mnohočetnou rezistenci na nádorová léčiva ovlivnit, ale iniciovalo zahájení vývoje inhibitorů P-gp. Inhibitory P-gp druhé generace, jako **valsopodar** (PSC-833, analog cyklosporinu) nebo **birikodar** (Incel) byly pro potlačování rezistence vhodnější než cyklosporin. Jejich aplikaci ale brzdily nevýhodné farmakokinetické vlastnosti, ovlivnění metabolismu cytostatik prostřednictvím jejich interakcí s cytochromem P450 3A4 a malá specifita – inhibitory blokovaly i další transportní proteiny. Úspěch by však mohly přinést inhibitory P-gp třetí generace (**tarikvidar**, **zosukvidar**, **lanikvidar**, **elakridar** a další), které byly nebo jsou klinicky zkoušeny v kombinaci s některými cytostatiky. Inhibítorem P-gp je i **mitotan** (Lysodren, BMS) zmíněný mezi klasickými protinádorovými léčivy



Nákladovost terapie protinádorovými léčivy

Vstup nových přípravků na trh protinádorových chemoterapeutik je nyní obtížnější než dříve. Příčinou je mnohem složitější, nákladnější a zdlohavější klinické zkoušení nových léčiv. Přesto nová protinádorová léčiva poměrně rychle přibývají. Jsou sice účinnější a selektivnější než dosavadní léky, jsou však také podstatně dražší. Za jeden z jejich nepříjemných vedlejších účinků je považována „finanční toxicita“.

Průměrná cena protinádorových léků je řádově vyšší než u léků ostatních terapeutických kategorií. V ČR činila průměrná cena balení protinádorových léčiv (L01) 6.680 Kč/bal., moderní „cílená“ léčiva ale průměr výrazně převyšují. Ceny některých nových protinádorových léčiv dosáhly takové výše, že je zdravotní pojišťovny odmítají hradit. To neplatí jen pro ČR, ale i pro další země. Příčinou vysokých cen nových léčiv je snaha farmaceutických firem o kompenzaci nákladů na zdlohavý a nákladný výzkum a vývoj i mimořádně vysoká náročnost výzkumu a výroby. Vzhledem k trvající patentové ochraně jsou vyhlídky na snížení cen nástupem generik nebo biogenerik nejbližších letech zatím jen malé.

V r. 2018 činily v ČR náklady na léky z ATC skupiny L (tj. léčiv používaných převážně v onkologických indikacích, ale také imunosupresiv z podskupiny L04 pro léčbu autoimunitních onemocnění a k potlačení odmítání transplantovaných orgánů organismem, ale bez antidot a jiných pomocných a podpůrných léků) 17,39 mld. Kč (ceny dodavatelů bez obchodní přírážky a DPH), což byla téměř čtvrtina celkových nákladů na všechny léky. Přitom ale podíl spotřeby těchto léčiv v doporučených denních dávkách (DDD) činil pouze 0,88% vydaných léčiv. Údaje o prodeji v jednotlivých podskupinách nebyly zatím uvedeny, v r. 2016 činily prodeje cytostatik (L01) 6,63 mld. Kč, léků pro endokrinní terapii nádorových onemocnění (L02) 0,76 mld. Kč a imunostimulátorů (L03) 2,41 mld. Kč. Ve srovnání s rokem 2017 došlo sice k poklesu nákladů na léky skupiny L o 7,4%, ale v předchozích letech vynaložené náklady vždy rostly, nejvíce (o 22,8%) mezi léty 2014 a 2015. Příčinou byly především vysoké ceny tehdy nově zaváděných moderních přípravků spolu s agresivnějšími způsoby terapie (kombinace různých léčiv, delší trvání léčby). V první desítku léčiv s nejvyšším objemem dodávek se u nás v r. 2016 objevily 5 přípravky používané v onkologii. Zejména přitom šlo o drahá „biologická léčiva“ (viz Farm10): na 3. místě se umístila protilátka trastuzumab (549 mil. Kč). V první desítku byly i další 2 protilátky: 4. byl bevacizumab (526 mil. Kč), 5. rituximab (506 mil. Kč) a), první nízkomolekulární protinádorové léčivo – tyrosinkinasový inhibitor imatinib se umístil až na 8. místě (429 mil. Kč).

Vysoké ceny neodráží jen složitou přípravu nových moderních léčiv (zejména „biologických“) ale promítají se do nich také snahy výrobců kompenzovat vysoké riziko neúspěchu při jejich klinickém zkoušení.

Klinické zkoušení bývá povolováno u pacientů s pokročilým stadiem nádorového onemocnění, kdy standardní terapeutické postupy buď úplně selhaly, nebo jsou málo účinné. Zkouší se tedy především jako tzv. léky druhé nebo i třetí volby. Pacienti v kontrolních skupinách nedostávají placebo, ale jsou léčeni dosavadními standardními postupy. Základním kritériem úspěchu klinického zkoušení bývá doba přežití pacientů nebo doba do progresu onemocnění. Někdy se provádí „historická kontrola“, kdy se srovnávají dosažené výsledky se starými záznamy o neléčených nebo jinak léčených pacientech. Zkoušení léku i u pacientů s časnými stadii onemocnění nebo „naivních“ (dosud neléčených) pacientů je většinou povolováno teprve poté, až se lék osvědčí, často až po několika letech. To bývá předmětem kritiky, jiný postup by však byl neetický.

Nová léčiva jsou povolována, jen když se prokáže, že jsou skutečným přínosem pro terapii.

Až do nedávné doby považovali experti FDA za prokazatelný přínos pouze prodloužení doby přežití nebo doby do výskytu nových příznaků onemocnění nejméně o 15%. Temozolomid nebyl v USA před časem doporučen panelem expertů FDA pro léčení metastázujícího melanomu, protože prodloužení doby přežití pacientů bylo ve srovnání s léčbou dakarbazinem sice zřetelné, ne však dostatečně velké (7,7 proti 6,4 měsíců). Nyní se kritéria pro schvalování nových léčiv poněkud změnila a každý přípravek je posuzován individuálně. Kromě doby přežití jsou v úvahu brány i případné jiné přínosy.

Ve snaze zastavit prudký růst nákladů na zdravotní péči hledají mnohé země možnosti úspory nákladů v úhradě léčiv. Do konfliktu s omezenými zdroji se přitom dostává zejména vysoká cena moderní protinádorové chemoterapie. To pak má za následek, že přístup pacientů k nejnovějším terapeutickým přístupům a možnostem efektivní protinádorové léčby bývá omezen.

Zavedení taxanů (paklitaxel, docetaxel) přineslo výrazné zlepšení výsledků léčby nádorových onemocnění vaječníků, prsu a plic, avšak současně značně zvýšilo nákladovost protinádorové léčby. Např. terapie kombinací cisplatiny a paklitaxelu stojí 10 x více než standardní léčba používající kombinaci cisplatiny a cyklofosfamidu. Proto jsou taxany předepisovány v průměru pouze asi 50% pacientům, kterým by mohly pomoci. Ve Velké Británii byla např. ještě nedávno léčba taxany hrazena pouze u 20% pacientů. Po protestech proti šetření na protinádorových léčivích musela britská vláda přislíbit nápravu a předepisování taxanů se rozšířilo.

Situace však není příznivá ani v jiných zemích. Vysoká nákladovost léčby brzdí preskripci dalších moderních léčiv. Jak již bylo zmíněno, velmi drahá je zejména léčba monoklonálními protilátkami (viz Farm10). Např. náklady na léčbu pacienta s nádorem pankreatu bevacizumabem (Avastin) činí až 800 tis. Kč za rok a za tuto částku se dosáhne často jen několikaměsíční prodloužení života. Roční léčbapacienta s kolorektálním karcinomu cetuximabem (Erbix) je ještě dražší a stojí až asi 2 mil. Kč. O mnoho nižší cenu nemá ani léčba trastuzumabem (Herceptin), která stojí cca 590 tis. Kč za rok. Trastuzumab, který přinesl pozoruhodné výsledky léčení určitého typu metastázujících nádorů prsu zejména při kombinaci s taxany a jehož použití je u některých skupin pacientek nákladově ještě poměrně efektivní, není pro vysoké náklady terapie běžně dosažitelný pro převážnou většinu evropských pacientek. Vysoké náklady na protinádorovou léčbu, při níž se obvykle používá kombinace několika léčiv, dále zvyšuje podávání chemoprotektiv, antiemetik a dalších přípravků podpůrné léčby – a samozřejmě i hospitalizace, nemocniční ošetření a časté kontroly. Vysoké náklady brzdí jejich využití prakticky po celém světě.

V ČR se v minulých letech podařilo uzavřít dohody České onkologické společnosti s VZP a některými dalšími pojišťovkami o rozsahu a podmínkách úhrady nákladné onkologické léčby. Moderní „biologická léčba“ je nyní aplikována několika tisícům pacientů ročně. Podle odhadu bývalého ředitele Masarykova onkologického ústavu by ale náklady na léčbu všech českých pacientů s nádorovým onemocněním s využitím nejnovějších možností medicíny činily přes 700 mld. Kč ročně. Takové náklady uhradit nelze, jsou téměř 2,5x vyšší než celkové roční výdaje ČR na zdravotnictví. Onkologové ale říkají, že se u nás ale vždy alespoň najdou prostředky pro léčbu těch pacientů, jimž protinádorové léky mohou zachránit nebo alespoň významně prodloužit život. Na léky, které život pacientů prodlouží jen o několik měsíců, ale prostředky již nejsou. Aktuální snahy o šetření nákladů na léky, materiál a vybavení nemocnic přitom vyvolávají obavy onkologů z většího omezování moderní účinné terapie.

Vzhledem k vysokým nákladům na léčbu onkologických pacientů mají největší úspěchy na poli boje s rakovinou ty země, které do zdravotnictví vkládají nejvíce prostředků.

V čele jsou USA s poměrně vysokou dobou přežívání nemocných. Mortalita má v USA sestupný trend a s výjimkou kožních nádorů je nižší než v Evropě. V letech 1975-79 žilo v USA 5 let od diagnózy kolorektálního karcinomu 51% bílých a 44% černých mužů a 53/48% žen, v letech 1995-2001 se podíl přežívajících zvýšil na 65,5/55,5% u mužů a 59,5/54,5% u žen. Mezi léty 1990 a 2007 došlo v USA k poklesu mortality na nádorová onemocnění u mužů o 22,2% a u žen o 13,9%. V r. 1990 činily v USA náklady na léčbu nádorových onemocnění celkem 104 mld. \$, ale kolem r. 2000 již 240 mld. \$. Nemalý podíl přitom představují náklady na protinádorové léky. V 80. letech se v USA spotřebovalo protinádorových léků za 200 mil. \$ ročně, v r. 1994 to již bylo 2,9 mld. a v r. 2000 už 9 mld. \$. Celkové výdaje systému Medicare, který v USA hradí léčbu seniorů starších 65 let a invalidních pacientů, vzrostly za desetileté období o 47%, ale u onkologické léčby to bylo o plných 267%. Mladší pacienti, i když jsou pojištěni, si musí sami hradit někdy i dosti značný podíl nákladů na léčbu a nádorové onemocnění se tak stává značnou finanční zátěží pro pacienta i jeho rodinu a v zemích s vysokou spoluúčastí pacienta dokonce příčinou osobních bankrotů. Růst nákladů na léčbu nádorových onemocnění přestává tak být únosný i pro nejbohatší země, jako je USA. Tam např. nedávno schválená buněčná léčba přípravkem Kymriah stojí 475 tis. \$.

Za závažný vedlejší účinek nových protinádorových léků je považována „finanční toxicita“. Různé státy se snaží omezit růst nákladů vydáváním standardů léčby a doporučení pro terapii, případně vazbou určitých způsobů léčení na výši pojistného nebo připojištění.

V ČR jsou běžné léky pro protinádorovou chemoterapii většinou plně hrazeny.

To však neznamená, že by i tyto léky mohly být libovolně předepisovány. Většina protinádorových léků je zařazena do kategorie "X", kde jsou hrazeny pojišťovny jako zvlášť účtované léčivé přípravky. Ty mohou být předepsány rámci lékového paušálu zdravotnického zařízení nebo po předchozím souhlasu revizního lékaře pojišťovny. Bohužel, při schvalování preskripcí se často hledí pouze na cenu léku a nepřihlíží k celkovým nákladům léčby, kam patří i cena hospitalizace a další přímé i nepřímé zdravotní výdaje. Horší situace ale je u nových moderních léků zaváděných do terapie. Řada z nich není u nás běžně hrazena, a to jak v případě biopolymerních léčiv se složitou přípravou, ale ani v případě léků nízkomolekulárních. Pacientům nejsou běžně hrazeny např. léky ze skupiny inhibitorů cdk4/6 jako je palbociklib a ribociklib protože dopad jejich použití při léčbě na rozpočet zdravotního pojištění se jevil jako příliš vysoký. Pojišťovny je hradí jen ve výjimečných případech po souhlasu revizního lékaře, kdy jde o jedinou možnost léčby. Pacienti si je ale mohou hradit sami. To jim ale vysoké ceny většinou nedovolují.

Omezenost zdrojů a nákladovost protinádorové terapie staví do popředí otázku volby terapeutického přístupu, aby se dosáhlo co nejlepšího poměru celkových nákladů na léčbu k dosaženému přínosu pro pacienta (cost/benefit ratio). Přitom je třeba brát v úvahu nejen ceny léků, ale i celkové náklady na léčbu. Srovnání celkových nákladů na různé způsoby terapie umožňuje **farmakoekonomika**. V ČR mají být farmakoekonomické rozbory využívány jako podklady pro kategorizaci léčiv.

Problémem je, že rozbory předkládá výrobce, který má zájem farmakoekonomické parametry svého léčiva vylepšit, např. vynecháním nákladů na potlačení vedlejších účinků. Při kategorizaci léků proto byla farmakoekonomika opomíjena a pouze se porovnávaly ceny léků určité terapeutické kategorie bez přihlídnutí k celkovým nákladům terapie.

Ve Spojeném království porovnává nákladovost terapie s jejími přínosy Národní ústav pro klinickou excelenci NICE (National Institute for Clinical Excellence). Z takového porovnání vyvodil NICE např., že léčba fludarabin fosfátem a monoklonálními protilátkami bevacizumabem a cetuximabem není nákladově efektivní. V USA má nyní vzniknout podobná instituce v rámci opatření prezidenta Trumpa na snižování cen léčiv.

V ČR se zabývá farmakoekonomikou léčby rakoviny drahými moderními léčivy Česká onkologická společnost, která ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz MU a Masarykovým onkologickým ústavem vede registry nákladné léčby převážně metastázujících nádorů bevacizumabem, cetuximabem, imatinibem, lapatinibem, sunitinibem, sorafenibem a pemetrexedem, sumarizuje její přínosy i negativa.

Nové protinádorové nebo pomocné léky mohou přispět ke zkrácení doby hospitalizace nebo intenzivní péče, snížení počtu návštěv u lékaře, potřeby diagnostických testů, léků k potlačení vedlejších účinků apod. V takových případech je jasné, jak má být farmakoekonomická analýza provedena. Otázkou však je jak postupovat, jestliže nový lék **prodlouží dobu života pacienta**.

Celkové náklady na léčbu a následné kontroly přitom obvykle vzrostou. Klasická farmakoekonomická analýza by přitom ukázala, že nový lék není farmakoekonomicky přínosný. Situace se však změní, zahrneme-li mezi přínosy i prodloužení života pacienta. Problémem přitom je, jak tento přínos objektivizovat, tj. jaké nákladové kritérium použít k rozhodování, zda má smysl pacientův život prodlužovat. Nedávno byly v USA porovnány náklady 4 různých režimů terapie u pokročilých stadií nádorů prostaty. Při léčbě docetaxelem činilo prodloužení doby života pacientů v průměru 72 dní, náklady za každý den života navíc činily 206 \$. Při léčbě abirateronem a prednisolonem to bylo 117 dní a 256 \$ na den, karbazitaxel prodloužoval život pacienta o 73 dní za 477 \$/den. Nejdéle, v průměru o 123 dní prodloužila život pacientů vakcína Provenge (sipuleucel T), náklady na jeden den života pacienta ale činily 757 \$. Otázkou přitom také je, jaká je kvalita prodloužovaného života. Např. v případě pokročilých stadií nemalobuněčného karcinomu plic zvyšují různé režimy kombinované chemoterapie ve srovnání s pouhou podpůrnou péčí medián přežití 2 – 3 x (z 9 – 22 týdnů na 20 – 37 týdnů).

Tři měsíce života navíc však mohou pacientovi současně přinést výrazné zhoršení kvality života, protože bude přitom vystaven toxickým účinkům cytostatik. Otázkou je, zda v takovém případě má být dána přednost nákladné chemoterapii před paliativní léčbou zmírňující příznaky onemocnění. **A zda je přitom chemoterapie účelná, protože při omezených zdrojích mohou náklady na léčbu jednoho pacienta znamenat, že budou chybět peníze na léčbu jiného pacienta s příznivější prognózou.**

Má-li takové rozhodování být objektivní, je třeba v prvé řadě určit nákladový limit, do něhož bude prodloužení života pacienta považováno za efektivní. Kromě pouhého prodloužení života je třeba brát v úvahu i **kvalitu prodloužovaného života pacienta.**

Vyčísľuje se proto zvýšení nákladů, které je třeba ve srovnání s dosavadní terapií vynaložit nejen na prodloužení doby života (LYG – Life Years Gained), ale na získání „roku života standardní kvality“, QALY (Quality Adjusted Life Year)“. Ty se přepočítávají vynásobením doby prodloužení života koeficientem vyjadřujícím stupeň poškození zdraví. Ten např. u pacienta s jednou amputovanou končetinou činí 0,5. U pacientky přežívající po chirurgickém odstranění nádoru prsu bez známek onemocnění jeden rok to je asi 0,75, při nejméně dvouletém přežívání bez známek nemoci se koeficient zvyšuje na 0,85. Dojde-li k metastázování primárního nádoru, pak přepočítávací koeficient klesne na 0,48. Jestliže se při nasazení nového léku prodlouží průměrná doba přežití pacientů o půl roku při kvalitě života vyjádřené koeficientem 0,7, pak se novou léčbou získá 0,35 QALY. Zvýší-li se přitom ve srovnání se současnou terapií náklady na léčení o 5 tis. \$, pak náklady na 1 QALY vzrostou o 14.285 \$. Podle WHO mají být nové léčebné postupy nákladově efektivní, jestliže 1 QALY nepřijde draž než je trojnásobek HDP na obyvatele. To je v ČR nyní cca 1,4 mil. Kč. V Evropě se terapie považuje za nákladově přijatelnou, jestliže její cena nepřesáhne 35.000 €/1 QALY, v USA je tento limit vyšší a má činit asi 100 tis. \$/QALY.

V budoucnosti bude snad možné snížit nákladovost léčby nádorových onemocnění zvýšením selektivity preskripce. Lepší znalost mechanismů účinku jednotlivých protinádorových léčiv a nové diagnostické postupy by měly umožnit **personalizovanou** neboli **individualizovanou terapii**. Tu zejména čeká velký rozvoj právě při léčbě pacientů s nádorovým onemocněním. Půjde o nasazení drahých protinádorových léčiv jen tam, kde lze předpokládat, že budou účinkovat a neztrácet čas a nezatěžovat pacienty ani pojišťovny a pacienty neúčinnou léčbou preparáty, které nebudou na jejich onemocnění působit a přitom mohou vyvolávat nežádoucí vedlejší účinky.

Současné možnosti diagnostiky pro predikci účinnosti určitého léčiva jsou zatím jen omezené. Genomické nebo proteomické analýzy jsou dosud stále poměrně nákladné a pojišťovny váhají s jejich úhradou. Vzhledem k extrémně vysokým cenám některých nových „biologických“ léčiv se specifickým účinkem, jsou však už nyní některé specifické testy farmakoeconomicky výhodné. Je to např. genomický test na zjišťování, zda pacientky s pokročilými stadii nádorů prsu mají na nádorových buňkách zvýšené množství genu pro receptor HER2 a mohla by jim proto pomoci léčba trastuzumabem. Ve vývoji je celá řada dalších testů, které umožní podobným způsobem predikovat výsledky určitých způsobů léčby a tak určit jakým směrem by se další léčba měla ubírat. Testy jsou však zatím vesměs příliš drahé. Např. výrobce zmíněného genomického testu si chrání svůj monopol patenty. Konkurence sice patenty soudně napadla pro nepřipustnost patentování přirozené DNA. Soud však rozhodl tak, že přirozené sekvence DNA patentovatelné sice nejsou, ale lze patentovat DNA zbařenou intronových sekvencí (viz Farm08).

Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co si představíte pod pojmem cílená terapie?
2. Co to jsou antiangiogenní látky?
3. Jak lze zablokovat přenos signálů k růstu a dělení buněk?
4. Jakou mají v buňce úlohu proteinkinasy a proč se jako protinádorové léky používají/zkouší jejich inhibitory?
5. Jakými léčivy lze regulovat buněčný cyklus?
6. Co to jsou telomery a jaký význam má jejich délka?
7. Co je telomerasa, jakou má úlohu v nádorových buňkách a jak ji lze inhibovat?
8. Co je to apoptóza a čím je spouštěna?
9. Co je proteasom a proč mohou být inhibitory proteasomu protinádorovými léčivy?
10. Jak lze využít mechanismy opravy DNA k protinádorové léčbě?
11. Co jsou epigenetické změny, jaký význam mají pro růst nádorů a jak je možné jim zabránit?
12. Co to je mnohočetná léková rezistence a jak ji lze překonávat?
13. Jaké jsou možnosti snížení nákladů na drahou protinádorovou terapii bez dopadů na léčbu pacientů?